
DER EINFLUSS VON T I Z O L E M I D
AUF ELEKTRISCHE AKTIVITÄT UND OSMOTISCHEN TRANSEPI-
THELIALEN WASSERFLUSS ISOLIERTER AMPHIBIENMEMBRANEN

Josef Konrad Früchtl

1982

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

DER EINFLUSS VON T I Z O L E M I D
AUF ELEKTRISCHE AKTIVITÄT UND OSMOTISCHEN TRANSEPI-
THELIALEN WASSERFLUSS ISOLIERTER AMPHIBIENMEMBRANEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josef Konrad Früchtl

aus
Cham-Altenmarkt

1982

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Eigler
Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1982



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. Jochen E i g l e r für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und vor allem für seine unermüdliche Unterstützung und stete Bereitschaft zu Ratschlägen und wertvollen Anregungen recht herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. Wolfram N a g e l für viele wichtige Hinweise zur Diskussion der vorliegenden experimentellen Untersuchungen.

Die experimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation wurden von Juni 1978 bis April 1979 durchgeführt.

Das Manuskript lag im Sommer 1979 vor, wobei Literatur bis Frühjahr 1979 herangezogen wurde.

Die in Klammern angegebenen Zahlen verweisen auf die entsprechende Stelle im Literaturverzeichnis.

I N H A L T

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. ALLGEMEINER TEIL	5
1. Transepithelialer Ionentransport	5
1.1 Geschichtlicher Überblick	5
1.2 Die isolierte Amphibienmembran als experimentelles Modell	8
1.3 Kurzschlußstrom-Technik von USSING und ZERAHN	9
2. Die Zwei-Membranen-Theorie von KOEFOED-JOHNSEN und USSING	10
2.1 Die mukosale Zellmembran	12
2.2 Das Transportkompartiment	15
2.3 Die serosale Zellmembran	18
3. Beeinflussung des Ionentransportes durch ADH und PGE_1	20
3.1 Antidiuretisches Hormon	20
3.2 Prostaglandin E_1	22
4. Der Einfluß von Diuretika auf die isolierte Amphibienhaut	23
4.1 Furosemid	23
4.2 Bumetanid	26
4.3 Hydrochlorothiazid	29

III. MATERIAL UND METHODIK	31
1. Versuchstiere, Präparation	31
2. Versuchsanordnung	33
2.1 Apparatur zur Bestimmung von Potential- differenz und Kurzschlußstrom	33
2.2 Apparatur zur Messung des Nettowasserflusses	34
2.3 Technische Daten	37
3. Verwendete Lösungen und Substanzen	38
3.1 Frosch-Ringerlösung	38
3.2 Biologisch wirksame Substanzen	39
4. Versuchsprotokoll	40
5. Auswertung der Ergebnisse und Statistik	42
IV. ERGEBNISSE	45
1. Der Einfluß von Tizolemid auf die elektri- schen Parameter der Amphibienhaut	45
1.1 bei Zugabe auf der Innenseite	45
1.2 Auswascheffekt	51
1.3 Einfluß von ADH	53
1.4 Wirkung von PGE_1	56
1.5 bei Zugabe auf der Außenseite	58
2. Veränderung des osmotischen Wasserflusses unter der Einwirkung von Tizolemid	60
3. Der Einfluß von Hydrochlorothiazid auf die elektrische Aktivität der Froschhaut	62

	Seite
3.1 bei Zugabe auf der Innenseite	62
3.2 bei Zugabe auf der Außenseite	63
4. Zusammenfassung der Ergebnisse	65
 V. DISKUSSION	 69
1. Methodenkritik	70
2. Wirkungscharakteristika von Tizolemid	72
3. Vergleich zwischen Tizolemid und anderen Diuretika	80
 VI. ZUSAMMENFASSUNG	 85
 VII. LITERATURVERZEICHNIS	 89

I. EINLEITUNG

Transmembranale Transportvorgänge gehören zu den fundamentalen Eigenschaften zellulären Lebens. In allen höher organisierten Lebewesen findet sich darüber hinaus ein gerichteter transzellulärer Transport, der insbesondere von transportaktiven Epithelien geleistet wird.

Zahlreiche epitheliale Strukturen sind zu einem derartigen gerichteten transzellulären Transport befähigt, so z.B. das Epithel des Magen-Darm-Traktes, alle Drüsenepithelien und - von größter Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung einer konstanten ionalen Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit, des sogenannten "inneren Milieus" - die Tubulusepithelien der Nieren:

So werden täglich in den Nieren des Menschen etwa 180 Liter Primärharn abfiltriert und anschließend zu mehr als 99 % wieder resorbiert. Voraussetzung für den Rückstrom dieser großen Flüssigkeitsmenge ist ein vorwiegend aktiver transtubulärer Transportprozeß, der u.a. die tägliche Resorption von annähernd 1,5 kg NaCl (in 180 l Primärharn) ermöglicht.

Qualitativ ähnliche Transportprozesse finden auch über die Haut von Amphibien statt, weshalb isolierte Amphibienmembranen als funktionelles Analogon zur Erforschung vor allem des aktiven Na-Transportes und dessen Beeinflussung durch verschiedenste Faktoren große Bedeutung erlangt haben (Kap. II/1.2). Die Wirkung von körpereigenen Substanzen (z.B. Vasopressin und Aldosteron), aber auch von synthetischen Stoffen, können an diesem experimentellen Modell in vergleichsweise einfacher

Weise untersucht werden. Dies gilt in besonderem Maße für die Analyse von Diuretikawirkungen.

Man erwartet von einem optimalen Diuretikum u.a. folgende Eigenschaften:

1. gute diuretische Wirksamkeit bei möglichst geringen Nebenwirkungen,
2. Hemmung transzellulärer Transporte speziell und spezifisch in der Niere,
3. Ausscheidung aller Ionen im gleichen Verhältnis, in dem sie im Extrazellularraum vorhanden sind.

Gerade die letztgenannte Forderung wird noch von keinem der heute verfügbaren Diuretika erfüllt, so daß es bei ihrer längeren Anwendung stets zu Störungen der Elektrolytverteilung besonders im extrazellulären Raum - folgeschwer vor allem die Hypokalämie - kommen kann. Es bleibt deshalb weiterhin eine Aufgabe pharmakologischer Forschung, nach möglichst "physiologischen" Diuretika zu suchen.

Einen Versuch in dieser Richtung stellt die Synthese des neuen, chemisch mit den Benzothiadiazinen verwandten Diuretikums "Tizolemid" dar, dessen transportaktive Eigenschaften in der hier vorliegenden Arbeit an der isolierten Amphibienmembran untersucht und den in der Literatur mitgeteilten Wirkungen von Furosemid und Bumetanid gegenübergestellt wurden.

Zusätzlich zu ihrer therapeutischen Wirksamkeit können Diuretika jedoch auch als experimentelle "tools" für die Analyse transepithelialer Elektrolyt-Transportprozesse und deren hormonaler Kontrolle - das in dieser Hinsicht bekannteste Beispiel ist Amilorid (41) - von Bedeutung sein.

In zweifacher Hinsicht - einmal wegen der möglichen klinischen Anwendung als Diuretikum und zum anderen wegen der möglichen Bedeutung, die dieser neuen Substanz für die weitere Erforschung transmembranaler Transportvorgänge zukommen könnte - schien es interessant, den Einfluß von Tizolemid auf den transepithelialen Natriumtransport über die isolierte Fröschhaut zu untersuchen.

Dabei zeigte Tizolemid eine deutliche und spezifische Wirkung: Bei Einwirkung auf der Innenseite der Bauchhaut konnte eine starke Inhibition des transepithelialen Natriumtransportes bei vier verschiedenen Spezies von Amphibien nachgewiesen werden.

II. ALLGEMEINER TEIL

1. Transepithelialer Ionentransport

1.1 Geschichtlicher Überblick

Die Erforschung der physiologischen Eigenschaften biologischer Membranen begann in der Mitte des 19. Jahrhunderts mit DU BOIS REYMOND (37), der erstmals an der isolierten Bauchhaut des Frosches eine Potentialdifferenz (PD) zwischen äußerer und innerer Oberfläche nachweisen konnte. Dabei verhielt sich die äußere Seite der Haut negativ gegenüber der inneren (zur Nomenklatur siehe Tabelle 1).

Bereits wenige Jahre später (1865) erkannte ROSENTHAL (133), daß die elektromotorischen Kräfte der Froschhaut näher der äußeren Oberfläche (also im Bereich der Epithelzellschicht) als der serosalen (inneren) Seite gelegen sein müssen.

Weitere wichtige Erkenntnisse über die elektrischen Eigenschaften der Froschhaut wurden dann um die Jahrhundertwende von GALEOTTI (58) beschrieben. In seinen Experimenten war die Potentialdifferenz an der isolierten und von Elektrolytlösung umspülten Membran (s. Anm. S. 7) nur dann vorhanden, wenn die Badlösung Natrium- oder Lithiumionen enthielt und GALEOTTI vermutete aufgrund dieser Abhängigkeit des Potentials von Na^+ bzw. Li^+ eine größere Permeabilität der Membran für diese Ionen in die innere als in die äußere Richtung.

1935 beobachtete HUF (79) an der isolierten und von beiden Seiten mit Ringerlösung umspülten Froschhaut

den Transport von Chloridionen (von der Außen- zur Innenseite der Haut). Obwohl er den Natriumtransport nicht untersuchte, postulierte HUF einen aktiven, einwärts gerichteten Transport von NaCl. Den ersten Hinweis auf einen derartigen aktiven Transportprozeß hatte bereits zwei Jahre zuvor FRANCIS (54) mit seiner Beobachtung der Abhängigkeit des Membranpotentials der Froschhaut von einem Oxydationsprozeß geliefert. Weitere Hinweise ergaben sich sehr bald durch KROGH (90), der die Fähigkeit von Fröschen, bei Bedarf NaCl auch aus stark verdünnten Lösungen aufzunehmen, registrierte und KATZIN (84), der erstmals 1940 mit radioaktiv markiertem Na^+ zeigen konnte, daß der Na-Fluß von der epithelialen zur serosalen Seite hin weit größer ist als in entgegengesetzter Richtung.

Nachdem ein Zusammenhang zwischen Membranpotential und Natriumtransport evident schien, gelang dann USSING (140, 141) an der isolierten Amphibienhaut erstmals der sichere Nachweis eines aktiven Natriumtransportes entgegen einem elektrischen und chemischen Gradienten. Während für diese und weitere Erkenntnisse über den Ionentransport die Entwicklung von Fluxanalysen (s. Anm. S. 7) mit radioaktiv markiertem Na^+ und Cl^- wesentlich waren, erlangte die Kurzschlußstrom-Technik von USSING und ZERAHN (142, Kap. II/1.3) für die weitere Erforschung des transepithelialen Natriumtransportes und seiner Beeinflussung durch Hormone und Pharmaka (z.B. 91, 125, 127) vor allem an der Amphibienhaut größte Bedeutung.

Tab. 1

Vergleichende Nomenklatur. In beiden Zeilen stehen sich funktionell einander entsprechende Begriffe gegenüber. Beide Spalten zeigen die Vielfalt einander entsprechender Termini.

Amphibienhaut (Frosch, Kröte)	Nierentubulus
anatomische Außenseite	Tubuluslumen
= äußere Membran	= die an das Tubuluslumen
= epitheliale Membran	angrenzenden Epithel-
= mukosale Membran	zellen der Nierentubuli
= apikale Membran	= lumenwärts gelegene
= epidermale Membran	Membran
	= apikale Membran
anatomische Innenseite	die dem Tubuluslumen abge-
= Blutseite der Haut	wandte Seite des Epithels
= Coriumseite	= Blutseite
= innere Membran	= peritubulärseitige Mem-
= serosale Membran	bran
= basale Membran	= basale Membran

Anmerkungen

Als "Membran" wird in der vorliegenden Arbeit nicht nur die Zellmembran (lipid-bilayer), sondern auch die Amphibienhaut als ganzes bezeichnet.

Der "Flux" ist definiert als der Betrag einer Ionenart, der pro Zeit- und Flächeneinheit die Membran in einer Richtung passiert.

1.2 Die isolierte Amphibienmembran als experimentelles Modell

Funktionelle Gemeinsamkeiten rechtfertigen die Verwendung von Amphibienhaut als Objekt zum Studium der Wirkungsweise von Diuretika: So wie im Nierentubulus vom Lumen zur Blutseite des Tubulusepithels ein Nettotransport von Na^+ -Ionen erfolgt, wird auch an der Froschhaut Natrium aktiv von der epithelialen zur serosalen Seite der Membran transportiert. Der aktive Na^+ -Transport erfolgt in beiden Geweben entgegen einem elektrischen und osmotischen Gradient in serosaler Richtung, es gelten z.T. ähnliche Permeabilitätscharakteristika.

In vieler Hinsicht ähnliche Eigenschaften bezüglich des Wassertransportes ergaben sich für die Amphibienhaut und die distalen Abschnitte des Nephrons (111). In Abwesenheit eines osmotischen Gradienten und ohne ADH sind sowohl Amphibienhaut als auch Sammelrohre der Säugerniere weitgehend impermeabel für Wasser. Durch ADH wird die Wasserpermeabilität in beiden Fällen erhöht (33).

An der Amphibienhaut können Transportvorgänge, im Gegensatz zu der schwierigen und experimentell sehr aufwendigen Untersuchung des Membrantransportes in der Niere, mit Hilfe der Kurzschlußstrom-Technik (Kap. II/1.3) in vergleichsweise einfacher Weise untersucht werden. Die Haut bleibt in isoliertem Zustand, bei Raumtemperatur und umgeben von einer einfachen Ringerlösung, über mehrere Stunden funktionsfähig, so daß ihr Verhalten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen beobachtet werden kann.

Die isolierte Amphibienhaut findet seit Einführung der Kurzschlußstrom-Technik vor allem aufgrund ihrer leichten experimentellen Handhabbarkeit als Modell zur Erfor-

schung des transepithelialen Ionentransportes breite Verwendung (heute wird sie - ihrer relativ dichten Zonulae occludentes wegen (45) - auch für Experimente mit der Mikroelektrode verwendet).

1.3 Kurzschlußstrom-Technik von USSING und ZERAHN

Diese Versuchsanordnung hat für die Analyse von transepithelialen Ionenbewegungen große Bedeutung erlangt und wurde im Prinzip auch in der vorliegenden Arbeit verwendet (Abb. 5). Im Experiment wird eine isolierte Amphibienmembran zwischen zwei Hälften einer Plexiglaskammer eingespannt und beidseitig von Ringerlösung umspült. Das spontane Membranpotential wird durch zwei an beiden Seiten der Membran anliegende Elektroden über ein Millivoltmeter gemessen. Dieses Potential ist außen (mukosal) negativ gegenüber der inneren (serosalen) Badlösung. Wird nun über zwei weitere, membranferne Elektroden aus einer externen Spannungsquelle eine Gleichspannung in der Höhe des spontanen Membranpotentials, jedoch in entgegengesetzter Richtung, angelegt, so läßt sich die Potentialdifferenz (PD) zwischen beiden Seiten der Membran auf Null kompensieren. Der dabei im äußeren Stromkreis fließende Strom wird als "Kurzschlußstrom" (KSS) bezeichnet.

An der so "kurzgeschlossenen" Membran besteht kein elektrischer Gradient. Wenn gleichzeitig die Membran auf beiden Seiten von identischen Elektrolytlösungen umspült wird und auch der hydrostatische Druck beider Badlösungen gleich ist, sind treibende Kräfte für einen passiven Nettotransport nicht mehr vorhanden. Nur aktiv transportierte Ionen werden unter diesen Bedingungen weiterhin die Membran passieren. Sie verursachen einen Strom-

fluß, der dem mit einem Mikroamperemeter gemessenen KSS im äußeren Stromkreis entspricht. Die Höhe dieses Stromes muß der pro Zeiteinheit netto transportierten Ladung äquivalent sein. (Durch Umrechnung mit Hilfe der Faraday-Konstante werden beide Mengen zum Vergleich in der gleichen Dimension ausgedrückt: $F = 9,65 \cdot 10^4$ Coulomb pro Grammäquivalent (C/val) und $1\mu A = 1\mu C/s$, das heißt $1\mu val/s = 96\,500\,\mu A$.)

In inzwischen klassisch gewordenen Experimenten konnten USSING und ZERAHN (142) durch gleichzeitige Messung von Kurzschlußstrom (KSS) und bidirektionalen Fluxraten (^{22}Na und ^{24}Na) zeigen, daß der über die Amphibienmembran fließende Strom tatsächlich dem aktiven transepithelialen Na^+ -Nettotransport äquivalent ist. Änderungen der Transportvorgänge infolge des elektrischen Kurzschlusses der Membran wurden dabei nicht beobachtet (102).

Mit Hilfe dieser KSS-Technik wurden wichtige Erkenntnisse über transepitheliale Ionenbewegungen gewonnen; diese sind auch Voraussetzung für das Verständnis und für die Bewertung der hier erarbeiteten Wirkungsscharakteristika von Tizolemid. Deshalb sollen im folgenden einige dieser Aspekte besprochen werden.

2. Die Zwei-Membranen-Theorie von KOEFOED-JOHNSEN und USSING

Zur Erklärung der im Laufe der Zeit veröffentlichten Ergebnisse über den transepithelialen Ionentransport an der Amphibienmembran haben verschiedene Autoren Modellvorstellungen entworfen, so z.B. KOEFOED-JOHNSEN

und USSING (88), USSING und WINDHAGER (144), CEREIJIDO und ROTUNNO (16), CUTHBERT (25), ZIEGLER (156), MULLEN und BIBER (112). Das Modell der erstgenannten Autoren wurde neuen Erkenntnissen entsprechend immer wieder modifiziert und kann auch heute noch wesentliche Eigenschaften der transportaktiven Amphibienmembran erklären. Es soll deshalb eingehender behandelt werden.

Grundlage für diese erste und auch für andere Modellvorstellungen war der Nachweis, daß der aktive Transport von nur einer Ionenart, nämlich der von Na^+ , für die Aufrechterhaltung der Potentialdifferenz (PD) an der isolierten überlebenden Froschhaut verantwortlich ist (142). Aufgrund dieser überragenden Bedeutung des aktiven Na-Transports für PD und Ionenbewegungen können die elektrischen Eigenschaften der Amphibienmembran durch das in Abb. 2 skizzierte Schaltbild dargestellt werden: Innere und äußere Badlösung stehen im Prinzip durch zwei elektrisch leitende Strukturen miteinander in Verbindung: die sog. Na-Pumpe (als deren treibende Kraft enzymatische Reaktionen der Na-K-ATPase gelten) in Serie mit den entsprechenden elektrischen Widerständen von serosaler und mukosaler Zellmembran und parallel dazu der Shuntwiderstand des parazellulären Transportweges vor allem für Chlorid und andere passiv diffundierende Ionen. In vivo auftretende Diffusionspotentiale im Shunt können bei den hier angestellten Betrachtungen über die Verhältnisse in vitro (bei beidseits gleichen Konzentrationen für passiv diffundierende Ionen) vernachlässigt werden (46).

In diesem "Zwei-Membranen-Modell" (Abb. 1) wird das transportaktive Epithel durch zwei Membranen charakterisiert, welche unterschiedliche aktive und passive Transporteigenschaften besitzen. Das Zellinnere wird dabei zunächst als sog. "black box" betrachtet, die Elektrolyte

und organische Moleküle in wässriger Lösung enthält. Das Potential entsteht aufgrund der asymmetrischen Eigenschaften beider Membranen (serosale Seite positiv gegenüber der mukosalen). Entsprechend diesem Modell tritt Natrium von der Außenseite her durch Diffusion in das Zellinnere ein und wird durch die innenseitige Membran - wahrscheinlich im Austausch gegen K^+ - wieder aus der Zelle geschleust. Der inneren bzw. äußeren Barriere der Amphibienhaut werden folgende Eigenschaften zugeschrieben:

1. Die mukosale Zellmembran ist selektiv und passiv permeabel für Na^+ (und Li^+). Darüberhinaus ist sie nur noch für Cl^- und andere kleine Ionen in geringem Maße durchlässig.
2. Die serosale Zellmembran ist praktisch impermeabel für Natrium und andere Kationen, jedoch durchlässig für Kalium und kleine Anionen wie Cl^- .
3. In oder an der serosalen Zellmembran befindet sich ein aktiver Transportmechanismus für Na^+ , die "Na-Pumpe".

Die wesentlichen Elemente dieses Zwei-Membranen-Modells konnten experimentell bestätigt werden, und über die einzelnen Schritte des transmembranalen Transportes von Na^+ liegen inzwischen genauere Erkenntnisse vor, die - soweit sie im Hinblick auf die Diskussion des Wirkungsmechanismus von Tizolemid von Bedeutung sind - im folgenden kurz dargestellt werden.

2.1 Die mukosale Zellmembran

Dem Natriumeinstrom in die Epithelzellen wird eine zentrale Rolle für die Kontrolle des transepithelialen Natriumtransportes zugeschrieben. Da, wie bereits erwähnt, das Epithel der Froschhaut aus mehreren Zellagen

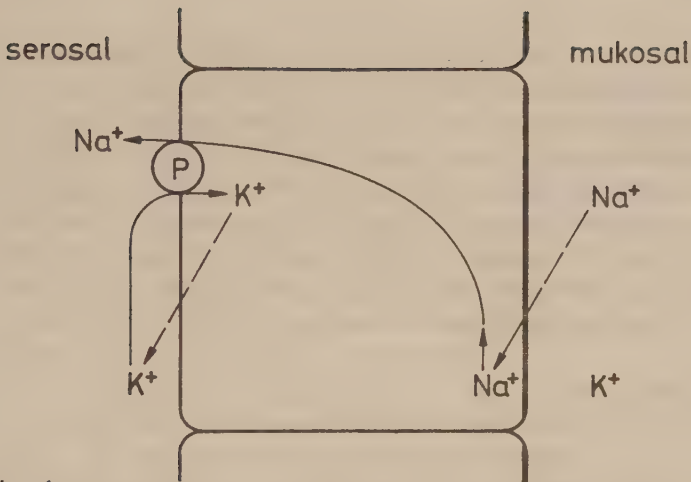


Abb. 1

Zwei-Membranen-Modell nach KOEFOED-JOHNSEN und USSING (88). Passiver Na-Einstrom und K-Efflux (gestrichelte Linien), Austausch von Na⁺ gegen K⁺ durch die Na-Pumpe (P und durchgezogene Linien). Ursprünglich war in analoger Form eine einzelne Zelle des Stratum germinativum dargestellt.

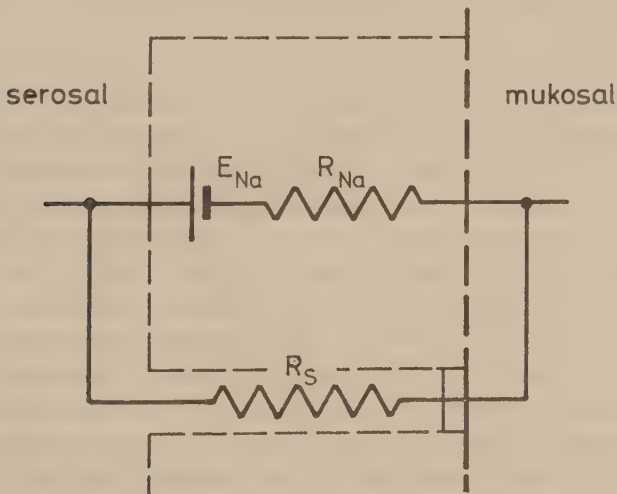


Abb. 2

Schaltbild zur schematischen Darstellung der elektrischen Eigenschaften der Amphibienhaut, modifiziert nach USSING und ZERAHN (142). E_{Na} = EMK der Na-Pumpe, R_s = Widerstand des parazellulären Transportweges, R_{Na} = Summe der Widerstände von serosaler und mukosaler Zellmembran.

besteht, war die Lokalisation der sog. äußeren Barriere des Transportkompartiments lange Zeit unklar. Inzwischen konnten jedoch mehrere Autoren mit verschiedenen Methoden nachweisen, daß die äußere Permeabilitätsschranke durch die mukosale Zellmembran der äußeren Lage des Stratum granulosum und den Zonulae occludentes gebildet wird (69, 105, 35, 85). Auch der gesamte transepitheliale Widerstand wird hauptsächlich durch die selektive Natriumpermeabilität dieser mukosalen Zellmembran bestimmt (45, 75).

Im KOEFOED-JOHNSSEN- und USSING- Modell ist die erste Stufe des Na-Transportes, der Na-Eintritt in die Epithelzelle, ein passiver und gleichzeitig selektiver Prozeß. Zwar bevorzugen - auch in jüngster Literatur - einige Forscher das Postulat eines aktiven Na-Influxes (z.B. 112), doch deuten weit mehr Befunde darauf hin, daß Na^+ (wie auch Li^+) durch selektive Kanäle in der epithelialen Membran passiv in die Zelle gelangt (93, 110, 95, 96).

Die Permeabilität der äußeren Barriere für Na^+ ist von verschiedenen Einflüssen abhängig; u.a. von der Na-Konzentration in der äußeren Badlösung: Die Na^+ -Permeabilität der Zellmembran nimmt bei erhöhter Konzentration ab und zeigt eine Sättigungskinetik (23, 130). Ähnliche Verhältnisse liegen für das permeable Kation Lithium vor (vgl. S. 17), welches offenbar die gleichen selektiven Poren durchwandert (64, 116). Darüberhinaus beeinflusst auch die intrazelluläre Na-Konzentration die Elektrodiffusion durch die genannten Na-Kanäle. Nach Blockade der Na-Pumpe mit Ouabain erhöht sich die intrazelluläre Na-Konzentration, was wiederum die Permeabilität der äußeren Zellmembran für Na^+ reduziert (93).

Auch andere Substanzen vermögen die Permeabilität der Na-Kanäle zu beeinflussen (z.B. 134, 8). Zu besonderer

Bedeutung gelangte hier Amilorid, das schon in sehr geringer Konzentration (ca. $10^{-7}M$) den Na^{+} - und Li^{+} -Transport sehr schnell und vollständig, aber voll reversibel, blockiert (41). Amilorid unterbindet den Na-Einstrom an der Außenseite der Zellmembran. Durch Verwendung von ^{14}C -Amilorid konnte die Zahl der Bindungsstellen für Amilorid an der mukosalen Zellmembran auf ca. 10^8 pro cm^2 kalkuliert werden (96). Dies entspricht einer gleichen Anzahl von Na^{+} -selektiven und durch Amilorid inhibierbaren Transportporen in der Membran.

Diese erste Transportstufe, welche geschwindigkeitsbestimmend für den transmuralen Natriumtransport ist, wird - vom Zytosol her - auch durch ADH, Prostaglandine und Aldosteron beeinflusst (Kap. II/3).

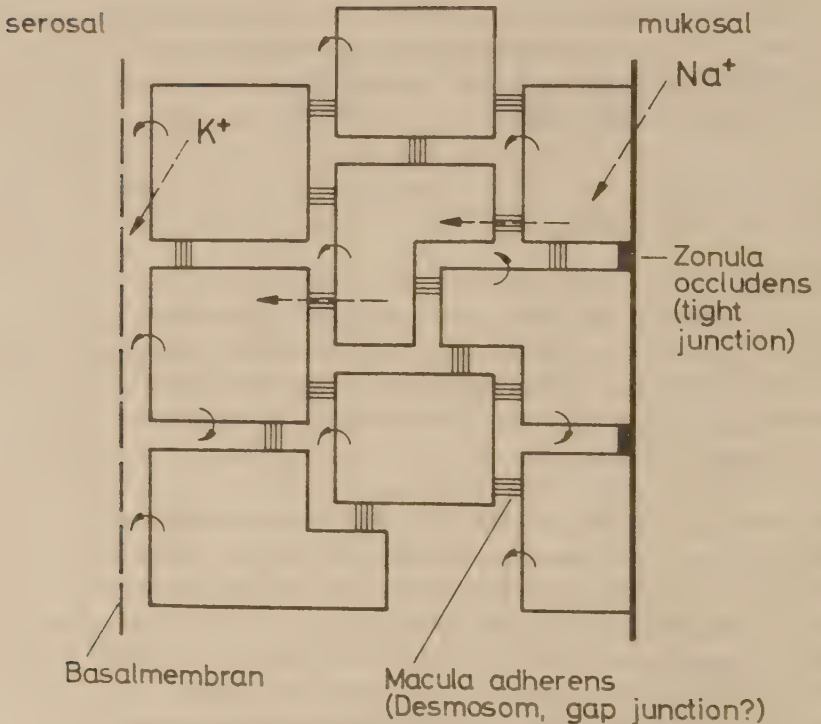
2.2 Das Transportkompartiment

Während über die Lokalisation einer - im funktionellen Sinn - "äußeren Barriere" heute weitgehend Einigkeit besteht (s.S. 14), birgt die "innere Barriere" und damit die Größe des Transportkompartiments, das durch äußere und innere Barriere begrenzt ist, noch zahlreiche ungeklärte Probleme.

Ursprünglich vermuteten KOEFOED-JOHNSEN und USSING (88), daß nur die innen gelegene Epithelzellige, das Stratum germinativum, das Transportkompartiment bildet. Spätere Untersuchungen von mehreren Autoren (1, 16, 155, 145, 146) gaben Anlaß zu der Vermutung, daß nur die Zellige des Stratum granulosum am aktiven Natriumtransport beteiligt ist. Nach ersten intrazellulären Messungen mit einer Mikroelektrode (wobei die dabei gefundenen Potentialstufen wahrscheinlich Artefakte darstellen, s. Lit.

Abb. 3

Schematische Darstellung eines Querschnittes durch die Epithelzellschicht der Froschhaut (ohne Stratum corneum) zur Verdeutlichung morphologischer und funktioneller Aspekte. Strata granulosum, spinosum und germinativum (von mukosal nach serosal). Zonulae occludentes dichten die interzellulären Räume zwischen den Zellen des Stratum granulosum nach außen hin ab, Desmosomen stellen wahrscheinlich permeable interzelluläre Verbindungen (gap junctions) dar. Die mukosale Zellmembran des Stratum granulosum ist selektiv permeabel für Na^+ . / passiver Ein- bzw. Ausstrom, ⤵ aktiver Natriumtransport.



115) postulierten USSING und WINDHAGER (144) ein auf alle Epithelzellen der Froschhaut (außer den Hornzellen) verteiltes Na-Transportsystem. Die Zellen sind demnach durch interzelluläre Brücken (Maculae adherentes, Desmosomen, gap junctions) mit geringem Widerstand untereinander verbunden (Abb. 3); funktionell würde dies einem Synzytium aller Epithelzellen entsprechen. Viele mit neueren und verbesserten Methoden gewonnene experimentelle Ergebnisse sind Indizien für diese Hypothese:

1. Neben Na^+ diffundiert auch Li^+ durch die gleichen Membranporen, besitzt jedoch eine weit geringere Affinität zur Na-Pumpe, weshalb es leichter in der Zelle akkumuliert. Verschiedene Autoren stellten eine bis zu zehnmal so hohe Li-Konzentration in allen Epithelzellen, verglichen mit der in der mukosalen Badlösung, fest (92, 116).

2. Da Ouabain die Na-Pumpe selektiv blockiert (87), müßten Ouabain-Bindungsstellen im Epithel die Lokalisation der Na-K-ATPase anzeigen. Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Ouabain wurde so nachgewiesen, daß alle lebenden Zellen im Epithel der Froschhaut an ihrer serosalen Oberfläche Ouabain-Bindungsstellen enthalten, in besonderer Dichte jedoch die Zellen von Stratum spinosum und Stratum germinativum (106). Zellen des Stratum granulosum, von mehreren Autoren (s.S. 15) als die eigentlichen transportaktiven Zellen betrachtet, waren im Vergleich zu den eben genannten Schichten nur dünn mit Bindungsstellen besetzt, ein Hinweis, daß ihnen nicht die Hauptlast am aktiven Natriumtransport zukommt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei methodisch anderem Vorgehen berichtet (49).

3. Bei Messungen der intrazellulären Konzentrationen von Natrium und Kalium mit Hilfe der Röntgen-Mikroanalyse erhöhte sich nach Inhibition des aktiven Transportmechanismus durch Ouabain die Na-Konzentration aller Epithelzellen durch Na-Influx von der mukosalen Seite (131). Dieser Effekt konnte durch Na-freie Badlösung oder durch mukosale Amiloridgabe verhindert werden. Ferner bewirkte der Austausch der äußeren Elektrolytlösung mit Aqua dest. eine Abnahme der Na-Konzentration in allen Epithelzellen, während der Ersatz des inneren Mediums mit Na-freier Lösung fast keine Wirkung zeigte. Selbst der Na-Efflux zur epithelialen (mukosalen) Seite hin konnte mit Amilorid von außen blockiert werden. Der Großteil

des intrazellulären Natriums aller Epithelzellen ließ sich also über die äußere (mukosale) Barriere austauschen. Ein synzytiales Transportkompartiment scheint aufgrund dieser Ergebnisse evident (35, 36).

4. In verschiedenen Berichten über Untersuchungen mit Mikroelektroden an Froschhautepithelien postulierte NAGEL (114, 117, 118) interzelluläre Kontakte für den Austausch von Ionen. Durch langsames Vorschieben der Mikroelektrode ergaben sich bei kurzgeschlossener Membran intrazelluläre Potentiale von ca. -90 mV, wobei beim Übergang der Elektrodenspitze von der ersten in eine tiefer (d.h. weiter serosal) gelegene Schicht das registrierte Potential auf Null abfiel, um beim Eintritt in die zweite Zelle wieder auf den ursprünglichen Wert anzusteigen. Nach serosaler Zugabe von Ouabain konnte ein prinzipiell gleiches Verhalten beobachtet werden, in allen Zellen war das Potential hierbei auf ca. -50 mV abgefallen. Der interzelluläre Raum kommuniziert also mit der serosalen Badlösung und die intrazellulären Räume der Epithelzellen sind miteinander verbunden, so daß ein Ionenaustausch möglich ist. Als mögliches morphologisches Substrat für den interzellulären Ionenaustausch gelten die im Elektronenmikroskop sichtbaren Zellverbindungen (Desmosomen, Lit. 48).

2.3 Die serosale Zellmembran

In Versuchen zur Ortsbestimmung der K^+ -sensitiven Barriere der inneren Epitheloberfläche (durch den Zeitverlauf der Potentialänderung nach schneller Erhöhung der K^+ -Konzentration in der serosalen Badlösung) stellten ACEVES und ERLIJ (1) fest, daß diese Barriere größer sein müsse als die innere Oberfläche des Stratum germinativum. Diese Ergebnisse werden bei Betrachtung des Epithels der Froschhaut als funktionelles Synzytium leicht verständlich. Dabei bestünde die innere Barriere des Transportkompartiments aus den innen gelegenen Zellmembranen des Stratum granulosum plus den Zellmembranen aller Zellen von Stratum spinosum und germinativum. Entsprechend groß wäre die serosale Oberfläche, weit größer als die äußere Oberfläche der Na^+ -selektiven Zellmembranen des Stratum granulosum.

Ein Hauptpunkt des KOEFOED-JOHNSEN und USSING-Modells (Abb. 1) ist, daß die homozelluläre Regulation von Na- und K-Gehalt und der aktive transzelluläre Na-Transport durch den gleichen Mechanismus vollbracht werden, nämlich durch eine Ouabain-sensitive Na-K-Austauschpumpe an der inneren Barriere. Dieses Postulat wurde bisher durch viele Befunde bestätigt (9, 24, 49, 73, 87, 106, 131, 143), jedoch ist der Umfang der Koppelung zwischen dem aktiven transepithelialen Na-Transport und dem K-Influx über die serosale Barriere bis heute unklar. Vermutlich existiert ein elektrogener Na-Transport, d.h. das Verhältnis des Austausches von Na^+ gegen K^+ ist größer als eins (118).

Während die besondere Bedeutung der äußeren Barriere in der selektiven Na-Permeabilität und dem dadurch ermöglichten transepithelialen Transport dieses Ions liegt, sind die Eigenschaften der serosal gelegenen Zellmembranen erste Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des zellinternen Milieus und für die Transportaktivität des Epithels. Der aktive Na-K-Austausch gemeinsam mit einer hohen Permeabilität für K^+ (und einer geringen für Na^+) serosal ist Voraussetzung für die intrazellulär niedrige Na-Konzentration sowie das hohe negative Potential und infolge dessen für den elektrochemischen Gradienten und den passiven Einstrom von Na^+ über die mukosale Membran.

3. Beeinflussung des Ionentransportes durch ADH und PGE₁

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Tizolemid schien insbesondere die Frage interessant, ob eine mögliche Interaktion dieses neuen Diuretikums mit ADH und PGE₁, deren biologische Effekte an der Froschhaut häufig analysiert wurden, nachzuweisen ist.

3.1 Antidiuretisches Hormon

Über die Zunahme der aktiven Transportrate für Na⁺ an der isolierten Froschhaut nach Zugabe von ADH (anti-diuretisches Hormon, Vasopressin) in die serosale Badlösung wird erstmals 1951 berichtet (56). Dieses Erkenntnis wurde später in die Zwei-Membranen-Theorie integriert mit der Annahme, daß das Hormon die Permeabilität der äußeren Barriere und damit den Na-Einstrom in die Zellen erhöht (4). Dieses Postulat wird durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt. Viele Befunde zeigen erhöhte intraepitheliale (5) und speziell intrazelluläre (34, 132) Na-Konzentrationen nach Stimulation durch ADH. Intrazelluläre Messungen des Potentials beweisen darüber hinaus, daß ADH den Widerstand der mukosalen Membran (= äußere Zellmembran des Stratum granulosum) weit mehr als durch frühere Untersuchungsergebnisse vermutet, reduziert (119). Unter dem Hormoneinfluß konnte auch eine verstärkte Affinität der postulierten Na-Kanäle zu Na⁺ (und Amilorid) gefunden werden (28), was - bei serosaler Zugabe - den Einfluß auf die mukosale Barriere ebenfalls bestätigt.

Die Frage nach der Erhöhung der Pumpaktivität durch ADH ist kontrovers. Während einige Untersucher eine erhöhte Pumpleistung lediglich infolge einer erhöhten intrazellulären Na-Konzentration vermuteten (63, 103), führ-

te ACEVES (2) mehrere Hinweise aus der Literatur und eigene Befunde als Indizien für einen ADH-Effekt auf die Na-Pumpe an. Sowohl ADH als auch cAMP stimulierten den Na-Efflux über die serosale Zellmembran signifikant, selbst nach Blockade des epithelialen Na-Einstroms mit Amilorid.

Weitere Untersuchungen zur genaueren Aufklärung des Wirkungsmechanismus von ADH (z.B. Änderungen im Zellvolumen (82) oder Dephosphorylierung bzw. Phosphorylierung eines Membranproteins (30, 52, 61, 62, 136)) seien hier nur erwähnt. Gesichert scheint lediglich die Rolle des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP), dessen Wirkung als Überträgerstoff von Hormonwirkungen durch SUTHERLAND (138, "second messenger"-Theorie) erkannt und durch ORLOFF und HANDLER (124) erstmals auch an der Amphibienmembran nachgewiesen wurde.

Antidiuretisches Hormon bindet sich reversibel an einen spezifischen Rezeptor an der serosalen Zellmembran (21, 136). Daraus resultiert eine Stimulation der membran gebundenen Adenylzyklase, die beschleunigt cAMP bildet. Dieses, ebenso wie exogen zugeführtes cAMP, bewirkt die Erhöhung des Natrium- und Wassertransportes. ADH stimuliert demnach direkt nur die intrazelluläre Synthese von zyklischem AMP, dessen Konzentration zusätzlich durch die Phosphodiesterase (Abbau von cAMP) kontrolliert wird (127).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die ADH-Reaktion einmal deswegen induziert, weil mit ihr die Erhaltung der Funktion des Transportmechanismus nach Einwirkung von verschiedenen Substanzen nachgewiesen werden konnte (Ausschluß irreversibler toxischer Epithelschädigung), zum anderen aber auch zur Klärung der Frage nach einer Interferenz zwischen Diuretikums- und Hormonwirkung.

3.2 Prostaglandin E₁

Die Prostaglandine stellen eine Gruppe von biologisch hochaktiven Verbindungen dar, welche ein weites Spektrum pharmakologischer Wirkungen zeigen und in den meisten Geweben zu finden sind (129). Insbesondere Prostaglandin E₁ (PGE₁), bereits in einer Konzentration von 10^{-8} M wirksam, kommt in transportaktiven Epithelien vor. Unter seinem Einfluß fanden verschiedene Untersucher an der Bauchhaut des Frosches (z.B. 7, 50) und an der Krötenblase (z.B. 99, 126) einen Anstieg des Kurzschlußstromes bei gleichzeitiger Abnahme von Potentialdifferenz und Membranwiderstand. LOTE et al. (100) führten die Steigerung des transepithelialen Na⁺-Transportes (KSS) auf eine Erhöhung des mukosalen Na⁺-Einstroms infolge einer veränderten Ionenpermeabilität zurück. Die Zunahme des intraepithelialen Na⁺-Gehaltes nach seroaler Inkubation mit PGE₁, die auch während der Blockade der Natriumpumpe durch Ouabain - jedoch nicht bei mukosaler Amilorid-Einwirkung - beobachtet werden konnte, stützt diese Hypothese (129). Auch Untersuchungen mit Mikroelektroden weisen die Abnahme des elektrischen Widerstandes der mukosalen Zellmembran als spezifischen Effekt von Prostaglandin nach (71).

Zur Frage nach dem molekularen Angriffspunkt von PGE₁ sei auf zwei Befunde hingewiesen. Die intrazelluläre Konzentration von cAMP war in Experimenten verschiedener Untersucher erhöht (99, 129), was auf eine Beeinflussung der Transportaktivität über dieses System schließen läßt. Andererseits vermindert PGE₁ den intraepithelialen Calciumgehalt und erhöht möglicherweise dadurch den mukosalen Natriumeinstrom (129). (Eine reduzierte zytoplasmatische Calciumkonzentration vergrößert den transepithelialen Natriumtransport, erhöhte verringert ihn (59).) Darüber hinaus ist der molekulare Wirkungsmechanismus von PGE₁ an der Amphibienmembran noch weitgehend ungeklärt.

In den letzten 30 Jahren wurde für eine Vielzahl von unterschiedlichsten Substanzen, wie Hormone (47), Katecholamine (139), Diuretika (42), Metallionen wie Magnesium (3) oder Calcium (59) und viele andere Stoffe eine Beeinflussung der elektrischen Aktivität bzw. auch des Nettowasserflusses an Amphibienmembranen festgestellt. Hier wurden lediglich die beiden, im Zusammenhang mit der vorliegenden experimentellen Arbeit wichtigen Faktoren ADH und PGE₁ beschrieben.

4. Der Einfluß von Diuretika auf die isolierte Amphibienhaut

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sollen in der Diskussion dieser Arbeit die vielfach untersuchten Wirkungscharakteristika der Diuretika Furosemid, Bumetanid und Hydrochlorothiazid (auch eigene Experimente) mit denen der neuen und bisher an der Amphibienhaut noch nicht untersuchten Substanz Tizolemid verglichen werden. Wichtige Ergebnisse von Versuchen mit den bereits bekannten Diuretika seien deshalb an dieser Stelle kurz dargestellt. Die Resultate der eigenen experimentellen Untersuchungen werden in Abschnitt IV ausführlich besprochen.

4.1 Furosemid

Wegen seiner starken diuretischen Wirksamkeit hat Furosemid schnell Eingang in die Klinik gefunden. Daneben hat es als sogenanntes "Schleifendiuretikum" auch für die experimentelle Nephrologie große Bedeutung erlangt.

Autor und Quelle	Membran	Konzentration (mM)	Seite der Inkubation	Einfluß auf PD	Einfluß auf KSS
HERMS und HOFMANN 1965 (72)	Bauchhaut von Rana esculenta	0,16 - 0,61	**	Anstieg auf 120 bis 150 %	Anstieg auf 120 bis 180 %
EIGLER et al. 1966 (40)	Bauchhaut von Bufo bufo	0,61	serosal	gleichförmige leichte Abnahme	Abnahme auf ca. 60 % innerhalb von 60 Minuten
			mukosal	Anstieg innerhalb v. 20 Min.	keine Änderung
FERGUSON 1966 (51)	Blase von Bufo marinus	0,76	**	*	leichter, nicht signifikanter Anstieg
LIPSON und HAYS 1966 (98)	Krötenblase ***	0,17	serosal	*	Abnahme auf 80 % innerhalb von 20 Minuten
KARGER 1967 (83)	Bauchhaut von Rana temporaria	1,51	**	Anstieg	keine Änderung, tw. leichter Anstieg
MOLINA et al. 1967 (107)	Krötenblase ***	7,6	**	Abnahme um 50 bis 80 %	Abnahme um 50 bis 80 %

FÜLGRAFF et al. 1973 (57)	Bauchhaut von Rana esculenta	1,8	serosal	Abnahme auf 50 bis 60 % in 30 bis 40 Minuten	Abnahme auf 40 bis 50 % in 30 bis 40 Minuten
			mukosal	sofortiger An- stieg auf 125 %	Anstieg auf ca. 120 %
MONTORIANO et al. 1975 (108)	Bauchhaut von Lepto- dactylus ocellatus	1,0	mukosal	Anstieg	Anstieg, gefolgt von Abnahme auf Kontrollwert nach 30 bis 60 Min.
WATLINGTON und JESSEE 1975 (148)	Bauchhaut von Rana pipiens	0,7	mukosal	*	keine signifikante Änderung
LOTE 1976 (101)	Bauchhaut von Rana temporaria	1,0	mukosal	anhaltender An- stieg	geringer Anstieg innerhalb von 5 Min., danach Ab- nahme auf Kon- trollwert
YORIO und BENTLEY 1976 (153)	Bauchhaut von Rana pipiens	0,5	serosal	keine Änderung	keine Änderung
			mukosal	Anstieg	keine Änderung

Tab. 2

Zusammenstellung der wichtigsten Untersuchungen über die Wirkung von Furosemid an Amphibienmembranen (ohne Anspruch auf Vollständigkeit). Soweit in den entsprechenden Veröffentlichungen ausdrücklich beschrieben, registrierten die Autoren LIPSON und HAYS, KARGER, WATLINGTON und JESSEE und LOTE einen deutlichen Anstieg des Membranwiderstandes nach serosaler Furosemid-Einwirkung.

* keine Angabe;

** Substanzzugabe offensichtlich beidseits, da nicht angegeben;

*** keine Angabe der Spezies.

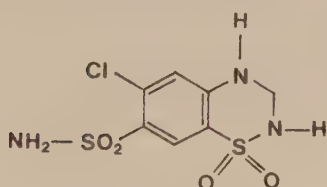
Die Ergebnisse von Experimenten an Bauchhaut bzw. Blasenepithel verschiedener Spezies von Amphibien sind in Tab. 2 zusammengestellt. Obgleich die Autoren z.T. differente Ergebnisse gewannen, die möglicherweise speziesbedingt sind oder durch sehr unterschiedliche Dosierungen zustande kamen, kann festgestellt werden, daß Furosemid bei serosaler Zugabe eine je nach Dosis mehr oder weniger stark ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom zeigt, mit einem damit einhergehenden Anstieg des aus PD und KSS berechneten Membranwiderstandes. Mukosale Applikation hatte dagegen bei allen Spezies einen Anstieg der PD und eine nur geringe Änderung des KSS zur Folge. Diese Veränderung der elektrischen Parameter nach Inkubation der mukosalen Membranseite wurde bereits von KARGER (83) als Hemmung der Cl^- -Permeabilität der äußeren Barriere des Transportkompartiments gedeutet, was durch Fluxanalysen bestätigt werden konnte (108, 101, 152). Auch die renale diuretische Wirkung von Furosemid wird der Inhibition des Cl^- -Transports im aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife zugeschrieben (14). Für die Inhibition des KSS nach serosaler Substanzzugabe wird dagegen eine Beeinflussung des Natriumtransportes durch Interferenz des Diuretikums mit dem intrazellulären Überträgerstoff cAMP postuliert (51, 53).

4.2 Bumetanid

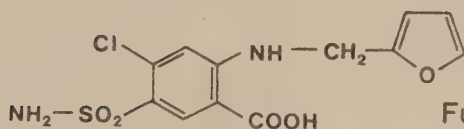
Hierbei handelt es sich um ein dem Furosemid strukturell sehr ähnliches Diuretikum (Abb. 4, Lit. 6). An der Bauchhaut des Frosches (*Rana temporaria*) bewirkt es - ebenso wie Furosemid - nach serosaler Inkubation (1 mM) eine signifikante Abnahme des KSS mit einem prozentual geringeren Abfall der PD und demzufolge einem Anstieg des transmembranalen Widerstandes (89). Bei Einwirkung

Abb. 4

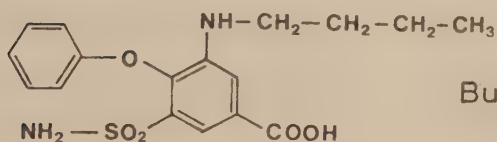
Strukturformeln verschiedener Diuretika, darunter die neue Substanz Tizolemid (HOE 740 B). Außer Bumetanid ist allen dargestellten Diuretika die 4-Chlor-3-sulfamoyl-phenyl-Gruppe gemeinsam (wie auch allen Diuretika der Benzothiadiazingruppe mit Hydrochlorothiazid als wichtigstem Vertreter).



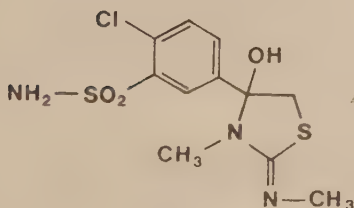
Hydrochlorothiazid



Furosemid



Bumetanid



Tizolemid
[HOE 740 B]

auf der mukosalen Seite der Amphibienhaut führt Bumetanid (10^{-4} M) zu einem Anstieg des KSS und zu einer geringen Erhöhung der PD, ganz im Gegensatz zur starken Zunahme unter mukosalem Furosemid-Einfluß. Ähnliche Resultate zeigen die in Abb. 15 (S. 81) dargestellten Untersuchungen (44). Diese Befunde deuten darauf hin, daß Bumetanid keine der Furosemid-Wirkung vergleichbare Blockade des Cl^- -Transportes verursacht. Möglicherweise erhöht es mukosal den Na^+ -Einstrom in die Epithelzellen und inhibiert serosal eine Stufe des aktiven Na^+ -Transportsystems (89). Während die Veränderung der elektrischen Aktivität nach Auswaschen von Furosemid nur sehr

internationaler Freiname (generic name)	Handels- name(n)	chemische Bezeichnung
Furosemid	Lasix Fusid u.a.	4-Chlor-N-furfuryl-5-sulfamoyl-anthranilsäure
Bumetanid	Fordiuran	3-Butylamino-4-phenoxy-5-sulfamoyl-benzoesäure
Hydrochloro- thiazid	Esidrix Diu 25 u.a.	6-Chlor-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazin-7-sulfonamid-1,1-dioxid
Tizolemid (HOE 740 B)	nicht im Handel	4-(4-Chlor-3-sulfamoyl-phenyl)-3-methyl-2-methylimino-1,3-thiazolidin-4-ol-hydrochlorid

Tab. 3

Gegenüberstellung der verschiedenen Bezeichnungen und Handelsnamen der in dieser Arbeit experimentell untersuchten bzw. besprochenen Diuretika.

langsam reversibel ist (40), kann nach Entfernen von Bumetanid aus der Badlösung eine rasche Normalisierung von KSS und PD beobachtet werden (89).

4.3 Hydrochlorothiazid

Vergleichende Untersuchungen an der Säugetierniere ergaben für dieses Medikament einen anderen Wirkungsmechanismus als den von Furosemid (137). Es überrascht deshalb nicht, daß Hydrochlorothiazid auch auf die isolierte Amphibienmembran einen qualitativ anderen Einfluß ausübt. Hier muß jedoch auf die Ergebnisse eigener Untersuchungen verwiesen werden (S. 62 - 64), da keine Veröffentlichungen von vergleichbaren Versuchen vorliegen. Weniger aussagekräftige Experimente mit beidseitiger Substanzzugabe zeigten bei 0,67 mM eine Steigerung von PD und KSS auf etwa 130 %, bei 1,68 mM dagegen einen Abfall von PD und KSS auf ca. 30 % der Kontrollwerte (72, 83).

III. MATERIAL UND METHODIK

1. Versuchstiere, Präparation

Die Untersuchungen wurden an der isolierten Bauchhaut von weiblichen und männlichen Fröschen der Spezies *Rana temporaria* (Laub-, Grasfrosch) durchgeführt. Bauchhäute von Kröten der Art *Bufo bufo* (*Bufo vulgaris*, europäische Erdkröte) dienten der Bestimmung des trans-epithelialen hydroosmotischen Nettowasserflusses (kurz: Wasserversuche). Dies erwies sich als zweckmäßig, da Wasserversuche wegen des sehr geringen Nettowassertransportes der Froschhaut nur schwierig durchzuführen sind.

Wenige orientierende Versuche mit *Rana esculenta* (Wassersfrosch) und *Bufo marinus* (amerikanische Kröte) dienten lediglich dem Nachweis eventuell vorhandener speziesbedingter Eigenarten bei *Rana temporaria*.

Alle Versuche an der Froschhaut wurden in der Zeit von Juli bis Dezember 1978, Wasserversuche mit *Bufo bufo* erst im April 1979, bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Bufo bufo-Kröten und sämtliche Frösche wurden von der Firma Zirm (Marktoberdorf, Bayern) geliefert. Die Kröten für die in Abschnitt IV mitgeteilten Wasserversuche wurden erst Ende März 1979 in Ungarn gefangen.

Die einzelnen Versuchsserien wurden nach Möglichkeit an aufeinanderfolgenden Tagen und mit derselben Lieferung von Fröschen durchgeführt, so daß Fehler, welche durch die jahreszeitlichen Schwankungen des spontanen Membran-

potentials entstehen (S. 70), innerhalb einer Serie weitgehend vermieden werden konnten.

Alle Frösche wurden bei Zimmertemperatur ($20 - 22^{\circ} \text{C}$) in einer Plastikwanne gehalten. Sie hatten stets freien Zugang zu fließendem Leitungswasser und wurden innerhalb von ca. zwei Wochen nach Ankunft im Labor verwendet.

Bufo bufo-Kröten wurden vor den Versuchen bei Zimmertemperatur auf trockenem Sand und Moos gehalten. Sie wurden mit Mehlwürmern gefüttert und hatten ebenfalls freien Zugang zu Leitungswasser.

Präparation

Die Versuchstiere wurden durch Scherenschnitt dekapiert und das Rückenmark mittels einer Sonde zerstört. Anschließend wurde die Bauchhaut mit einer Schere überwiegend stumpf abpräpariert und kurzzeitig in Frosch-Ringerlösung (S. 38) gespült. Die blutgefüllten Hautgefäße an der Serosa der Bauchhaut wurden vorsichtig und sauber ausgestrichen.

Bei größeren Tieren gelang es, aus der Bauchhaut eines Frosches bzw. einer Kröte zwei Membranen gleicher Größe für zwei Apparaturen zu isolieren, so daß eine Hälfte als Kontrolle diente. In der Mehrzahl der Versuche mit *Rana temporaria* war dies jedoch nicht möglich; es handelt sich bei den hier mitgeteilten Daten um Versuche an paarigen und nichtpaarigen Membranen.

2. Versuchsanordnung

Nach Präparation und Spülung wurde die isolierte Bauchhaut zwischen zwei Hälften einer zylindrischen Plexigaskammer gespannt, wodurch beide Kammerhälften durch die Membran getrennte Hohlräume bildeten. Somit konnte die Membran von beiden Seiten mit unterschiedlichen Lösungen umspült werden.

2.1 Apparatur zur Bestimmung von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom (sog. "Ussing-Kammer")

Die Plexigaskammer folgte in ihrem Konstruktionsprinzip den Angaben von USSING und ZERAHN (142). Einzelheiten sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Beide Kammerhälften bestanden aus durchsichtigem Kunststoffmaterial und hatten außen die Form von Zylindern, innen jedoch die Form von Kegeln mit einer offenen, von der Membran bedeckten Grundfläche von $3,14 \text{ cm}^2$ (Durchmesser 2 cm). Jede Kammerhälfte faßte ein Volumen von 12 ml.

Zwei Bohrungen in jeder Kammerhälfte dienten der Einbringung von Elektroden, über die Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom gemessen werden konnten. Membrannah waren zur Messung der Potentialdifferenz beidseitig zwei dünne Ringer-Agar-Brücken eingebracht, deren äußere Enden über eine gesättigte KCl-Lösung (ca. 3molar) mit zwei Kalomelektroden in Verbindung stand. Diese Meßbrücken wiesen häufig ein Asymmetriepotential auf, das vor dem Einspannen der Membran bestimmt und mittels einer Gleichspannungsquelle (4,5 V) auf Null kompensiert wurde. Es betrug maximal $\pm 5 \text{ mV}$.

Als Stromelektroden wurden weitlumigere und gleichzeitig wesentlich kürzere Ringer-Agar-Brücken verwen-

det, die mit ihrem geringeren Eigenwiderstand den Stromfluß weniger beeinträchtigten. Sie tauchten an den äußeren Enden der Kammern in die Badlösung, ca. 4,5 cm von der Membran entfernt. Die beiden anderen Enden dieser Ringer-Agar-Brücken standen über eine 3molare KCl-Lösung mit zwei Silberdrahtwendeln in Kontakt, die wiederum über das Mikroamperemeter mit einer stufenlos regelbaren Gleichspannungsquelle (90 V) verbunden waren. So konnte über diesen Stromkreis eine dem spontanen Membranpotential entgegengerichtete Spannung angelegt werden, die den Kurzschlußstrom erzeugt (Kap. II/1.3).

Je eine weitere Bohrung am Boden und am Dach jeder Kammerhälfte diente zum Auslassen bzw. zum Einfüllen der Badlösung und zum Einbringen der verschiedenen Testsubstanzen. Gleichzeitig konnte die Badlösung - durch ständige Luftdurchperlung - über diese beiden Öffnungen in Membrannähe zirkulieren, was neben der gleichmäßigen Verteilung der Testsubstanzen auch die Versorgung der Haut mit Sauerstoff sicherstellte (Abb. 5).

2.2 Apparatur zur Messung des Nettowasserflusses

Zur Messung des transmembranalen hydroosmotischen Nettowasserflusses wurde eine nach EDELMAN et al. (38) sowie LICHTENSTEIN und LEAF (94) modifizierte Ussing-Kammer verwendet. Wie Abbildung 6 schematisch zeigt, unterscheidet sich diese Apparatur von der in 2.1 beschriebenen durch die Vorrichtung zur Messung des Nettowasserflusses. Damit war die Möglichkeit vorhanden, neben PD und KSS auch den Wasserfluß durch die Amphibienhaut fortlaufend zu messen.

Abb.5

Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung von Potentialdifferenz (PD) und Kurzschlußstrom (KSS) an isolierten epithelialen Membranen (nach USSING und ZERAHN, 142).

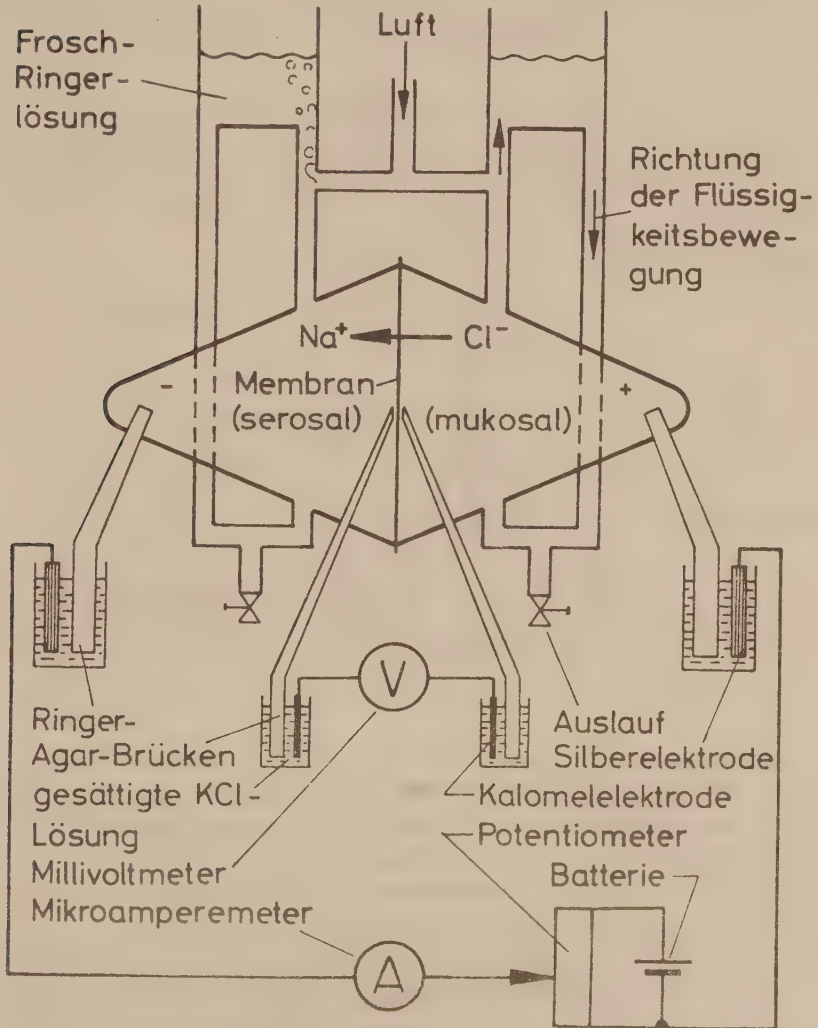
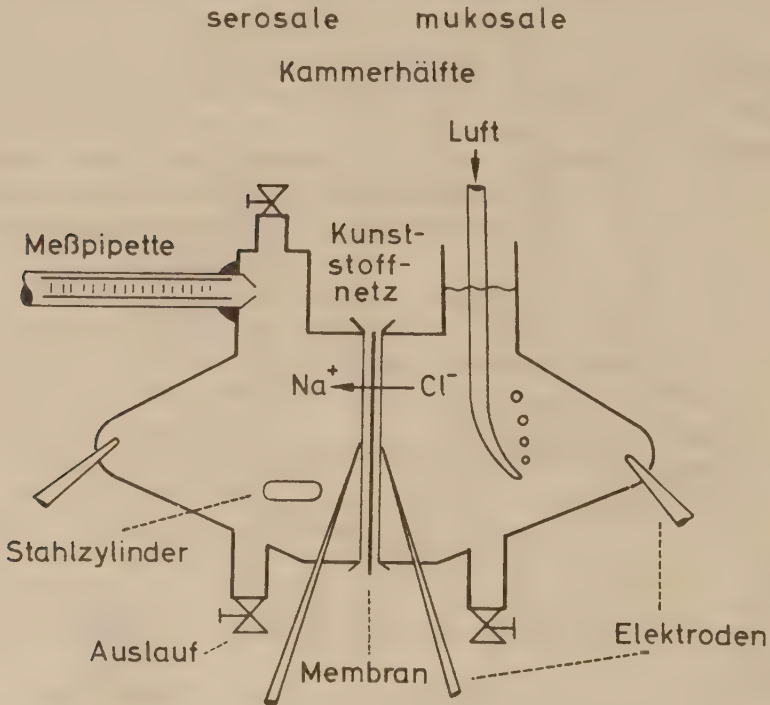


Abb. 6

Schema der nach LICHTENSTEIN und LEAF (94) sowie EDELMAN et al. (38) modifizierten Ussing-Kammer zur Messung des transepithelialen hydroosmotischen Nettowasserflusses.



Die der Membranninnenseite zugewandte Kammerhälfte war allseits verschlossen, mit Ausnahme einer zusätzlichen Bohrung, in der eine graduierte Pipette ($1,0 \pm 0,01$ ml) die Registrierung von Volumenzunahmen in dieser Kammerhälfte gestattete. Um auch geringe Membranundulationen zu verhindern, wurde an beiden Seiten der Membran ein feines Kunststoffnetz angebracht und die Kammer mit einem Dichtungsring (Gummi) sorgfältig abgedichtet. Die serosale Badlösung (12 ml) wurde mit

einem in die entsprechende Kammerhälfte eingebrachten mit Kunststoff beschichteten Stahlzylinder und einem außen aufgestellten Magnetprüher in Bewegung gehalten. Zur Versorgung der Bauchhaut mit Sauerstoff und um die Ringerlösung in Bewegung zu halten wurde die Badlösung auf der epithelialen Membranseite (15 ml) mit Luft durchperlt (Abb. 6).

Die elektrischen Parameter konnten auch mit dieser Versuchsanordnung - in der gleichen Weise und mit dem gleichen apparativen Aufwand wie unter 2.1 beschrieben - gemessen werden.

2.3 Technische Daten

Ringer-Agar-Brücken: Zur Messung von PD und KSS wurden unterschiedliche Elektroden angefertigt. Als Spannungselektroden dienten mit Agargel gefüllte durchsichtige PVC-Schläuche mit einer lichten Weite von 1,0 mm und einer Länge von 30 cm. Zur Strommessung wurden ebenfalls mit Agargel gefüllte PVC-Schläuche verwendet, jedoch betrug deren innerer Durchmesser 3,0 mm und deren Länge 15 cm (geringerer elektrischer Widerstand). Das Ringer-Agargel wurde durch Erhitzen von 1 g Rein-Agar (Behring-Werke, Marburg) in 30 ml Frosch-Ringerlösung hergestellt.

Die verwendeten Kalomelelektroden stammten von der Firma Radiometer A/S, Kopenhagen (Typ K 4112). Alle Silberwendel wurden aus reinem Silberdraht (0,6 mm Durchmesser) hergestellt und an flexible, zum Mikroamperemeter führende Kupferleitungen angelötet.

Meßinstrumente: Zur Messung der PD wurde ein Millivoltmeter (Meßgerät der Fa. Gossen, Verstärker der Fa. Knick)

mit der Anzeigegenauigkeit von $\pm 0,7$ mV verwendet. Der KSS wurde mit einem Mikroamperemeter der Firma Gossen (Anzeigegenauigkeit ± 2 μ A) bestimmt.

Die Substanzzugabe erfolgte mit Mikropipetten der Firma Eppendorf (Modell 3130) zu 500 μ l und zu 100 μ l.

3. Verwendete Lösungen und Substanzen

3.1 Frosch-Ringerlösung

Die verwendete Frosch-Ringer-Stammlösung enthielt folgende Ionenkonzentrationen:

Na^+	113	mM
K^+	2	mM
Ca^{++}	1	mM
HCO_3^-	2,4	mM
Cl^-	115	mM.

Bei den Versuchen zur Messung des transepithelialen Nettowasserflusses wurde auf der serosalen Membranseite normale Frosch-Ringerlösung, auf der epithelialen Seite jedoch eine mit Aqua dest. 1:10 verdünnte Ringerlösung verwendet.

Die Osmolalität der Frosch-Ringerlösung betrug 215 mosm/kg H_2O , die der 1:10 verdünnten Ringerlösung 25 mosm/kg H_2O . Dies ergab bei den Wasserversuchen einen osmotischen Gradienten von 190 mosm/kg H_2O an der Membran.

Um eine Beeinflussung der Membranfunktion durch eine zu stark erhöhte oder erniedrigte Wasserstoffionenkonzentration (134) als Störfaktor auszuschließen, wurde in

mehreren Stichproben das pH der Badlösungen nach dem Versuch bestimmt (pH-Meter der Fa. Knick). Das pH lag dabei nach Luftdurchperlung immer zwischen minimal 7,2 und maximal 8,4.

3.2 Biologisch wirksame Substanzen

TIZOLEMID ist eine neue von der Firma Hoechst AG (Frankfurt/M.) entwickelte diuretisch wirkende Substanz, deren Wirkungen auf die elektrischen Parameter und auf den Nettowasserfluß an Amphibienmembranen in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich untersucht wurden. Ihre vorläufige Kurzbezeichnung war HOE 740 B, die chemische Bezeichnung enthält Tab. 3 (S. 28). Abb. 4 (S. 27) zeigt die chemische Ähnlichkeit dieses Präparates mit modernen, in der Klinik bereits bewährten Diuretika. Die Substanz (Molekulargewicht 372,3) hatte eine maximale Löslichkeit in Aqua bidest. von ca. 2 % (19 mg/ml H₂O bei 20° C) bei einem pH dieser Lösung von ca. 4,5. Da es bei längerem Stehenlassen zu Ausflokungen kam, wurde die Tizolemid-Stammlösung wöchentlich neu angesetzt.

HYDROCHLOROTHIAZID (HCT, Tab. 3, Abb. 4) wurde als Reinsubstanz der Firma Hoechst verwandt. Es konnte nur in alkalisiertem Aqua bidest. (0,4 ml 1n NaOH auf 5 ml Aqua) in geeigneter Konzentration gelöst werden. Durch Zugabe von 0,5 ml dieser alkalisierten HCT-Lösung (pH 10,7) in 12 ml Frosch-Ringerlösung auf der serosalen Membranseite veränderte sich das pH der Badlösung jedoch nicht wesentlich. Die Konzentration von HCT in der Badlösung betrug 2 mM (MG: 297,7).

ANTIDIURETISCHES HORMON (ADH, Vasopressin) wurde aus handelsüblichen Ampullen zu je 1 ml (Pitressin^R, Parke-

Davis, München) entnommen und der serosalen Badlösung zugesetzt.

PROSTAGLANDIN E₁ (PGE₁) kam als Reinsubstanz (95 % rein) von der Firma Serva Feinbiochemica (Heidelberg) zur Anwendung. Jeweils 1 mg Substanz wurden in 2,35 ml Äthanol absolut gelöst, so daß durch Zugabe von 0,1 ml dieser Stammlösung zur serosalen Badlösung eine Prostaglandinkonzentration von $10^{-5}M$ erreicht wurde (Molekulargewicht 354,5).

4. Versuchsprotokoll

Vor jedem Versuch wurde das Asymmetriepotential, die sogenannte Leerspannung, gemessen und kompensiert (S. 33). Sodann wurde die Amphibienhaut vorbereitet (S. 32) und zwischen beide Kammerhälften der Apparatur gespannt. Bei allen Versuchen wurde eine Äquilibrationsperiode von 60 bis 120 Minuten eingehalten. Erst danach konnte mit im Zeitverlauf konstanten elektrischen Parametern gerechnet werden. In Kontrollversuchen wurde das gleiche Volumen an jeweiligem Lösungsmittel zugegeben.

Wegen der großen Unterschiede in der elektrischen Aktivität der von verschiedenen Tieren stammenden Bauchhäute wurde jeweils der unmittelbar vor Substanzzugabe (= Zeitpunkt Null) gemessene Wert von PD oder KSS gleich 100 gesetzt und alle nachfolgenden Meßwerte als prozentuale Änderungen dieses Ausgangswertes bestimmt. Der nach dem Ohmschen Gesetz errechnete elektrische Widerstand der Membran wurde ebenfalls in Prozent des Nullwertes angegeben.

Die Messung von PD, KSS und - bei Wasserversuchen - ΔW erfolgte in Abständen von 15 Minuten (Tab. 4). Aus zahl-

Tabelle 4

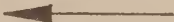
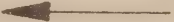
Beispiel zur Protokollführung. PD und KSS wurden direkt mit den entsprechenden Instrumenten gemessen, der elektrische Widerstand der Membran R (angegeben in Ω) sowie alle Prozentwerte wurden aus diesen Daten berechnet.

Datum: 14.11.1978

Versuchsserie: Tizolemid 2mM serosal*, nach 60 Min. 3mal
Badwechsel, nach 90 Min. ADH 100 mE/ml
serosal

Bauchhaut von Rana temporaria

Badlösung: beidseits Frosch-Ringerlösung

Zeit	PD (mV)	PD (%)	KSS (μ A)	KSS (%)	$R = \frac{U}{I}$	R (%)	Bemerkungen
9.40	37		122		303		Äquilibrationssperiode
11.05	41	100	101	100	406	100	
11.20	41	100	101	100	406	100	
11.35	35	85	83	82	422	104	 Zugabe von Tizolemid 2 mM serosal
11.50	34	83	71	70	479	118	
12.05	31	76	61	60	508	125	
12.20	28	68	45	45	622	158	
12.35	27	66	48	48	562	138	 Auswaschen durch 3maligen Badw.
12.50	25	61	51	50	490	121	
13.05	31	76	96	93	323	80	 Zugabe von ADH 100 mE/ ml
13.20	30	73	111	110	270	67	
13.35	35	85	118	117	297	73	
13.50	39	95	118	117	330	81	

* Endkonzentration in der Badlösung

reichen Versuchen verschiedener Autoren ist bekannt, daß diese intermittierende Meßweise weder zu einer Schädigung der Membran noch zu einer Veränderung der elektrischen Parameter bzw. des Ionentransportes führt (19).

Bei allen in dieser Arbeit erwähnten Wasserversuchen wurde nach der einstündigen Vorperiode sowie nach der ebenfalls einstündigen Inkubation mit Tizolemid ein Pipettenwechsel vorgenommen. Danach wurde ein Zeitabstand von drei Minuten bis zur nächsten Registrierung eingehalten, so daß sich durch Pipettenwechsel entstandene Druckschwankungen ausgleichen konnten.

Um auch eventuelle kurzzeitige Änderungen von PD und KSS unter Einwirkung einer Substanz zu erfassen, wurde bei den ersten Versuchen einer jeden Serie auch in ein- bis fünfminütigen Abständen gemessen.

Die häufig wiederholten Messungen von PD und KSS erstreckten sich über einen Zeitraum von maximal 6 Stunden, je nach Art des gewählten Meßprogrammes. Am Ende von mehreren zufällig ausgewählten Versuchen wurde das pH beider Badlösungen kontrolliert.

5. Auswertung der Ergebnisse und Statistik

Die isolierten Amphibienhäute zeigten oft eine erhebliche Schwankung der elektrischen Aktivität, selbst wenn zwei Membranen von der Bauchhaut desselben Tieres stammten. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse wurden deshalb meist prozentuale Änderungen von PD und KSS in bezug zu den entsprechenden Ausgangswerten beurteilt. Diese auf 100 bezogenen Werte ergaben sich durch Um-

rechnung jedes einzelnen Meßwertes:

$$x = \frac{t_x}{t_0} \cdot 100$$

x Prozentwert
 t_x Meßwert
 t_0 Meßwert zum Zeitpunkt Null.

Für die verschiedenen Versuchsserien wurden nur Membranen verwendet, die zum Zeitpunkt Null eine PD von 20 bis 90 mV und gleichzeitig einen KSS von mindestens 50, höchstens aber $240 \mu\text{A} \cdot 3,14 \text{cm}^{-2}$ aufwiesen.

Aus den Einzeldaten jeder Meßzeit wurden Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) sowie Standardfehler der Mittelwerte ($\pm 1 \text{ SEM}$, standard error of mean) in der üblichen Weise berechnet.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p), mit der eine Aussage gemacht werden konnte, ergab sich nach Berechnung von t und Ermittlung der Signifikanzschränken der Student-Verteilung (Tabelle). Ein Unterschied wurde dabei als statistisch signifikant bezeichnet, falls $p < 0,01$ oder aber als statistisch auffällig, falls $0,01 < p < 0,05$.

Der t-Test für paarige (=verbundene) Stichproben wurde immer dann angewandt, wenn die Veränderung eines Parameters (PD, KSS, ΔW) im Verlauf der Zeit innerhalb einer Experimenten- bzw. Kontrollserie beurteilt werden sollte, d.h. wenn zwei Reihen von Meßdaten an denselben Versuchstieren verglichen wurden. In den meisten Fällen kam jedoch der t-Test für unpaarige (=unverbundene) Stichproben zur Anwendung.

IV. ERGEBNISSE

1. Der Einfluß von Tizolemid auf die elektrischen Parameter der Amphibienhaut

1.1 bei Zugabe auf der Innenseite

Die Zugabe von Tizolemid zur serosalen Badlösung bewirkte in allen Experimenten eine deutliche Abnahme von Potentialdifferenz (PD) und Kurzschlußstrom (KSS). Bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ an der Innenseite der Bauchhaut von *Rana temporaria* war die Abnahme von PD und KSS bereits nach 15 Minuten hoch signifikant mit $p < 0,001$ im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (Abb. 7). Nach 60 Min. war die PD auf 61,8 % des Ausgangswertes (=100%), der KSS auf 36,8 % abgefallen. In der gleichen Zeit veränderten sich die Werte der Kontrollen nur unwesentlich (99,3 bzw. 95,8 %).

Wie die Meßergebnisse einer repräsentativen Kontrollgruppe in Abb. 7 zeigen, werden von der Amphibienmembran unter den in Abschnitt III beschriebenen Bedingungen PD und KSS über einen längeren Zeitraum praktisch konstant erhalten.

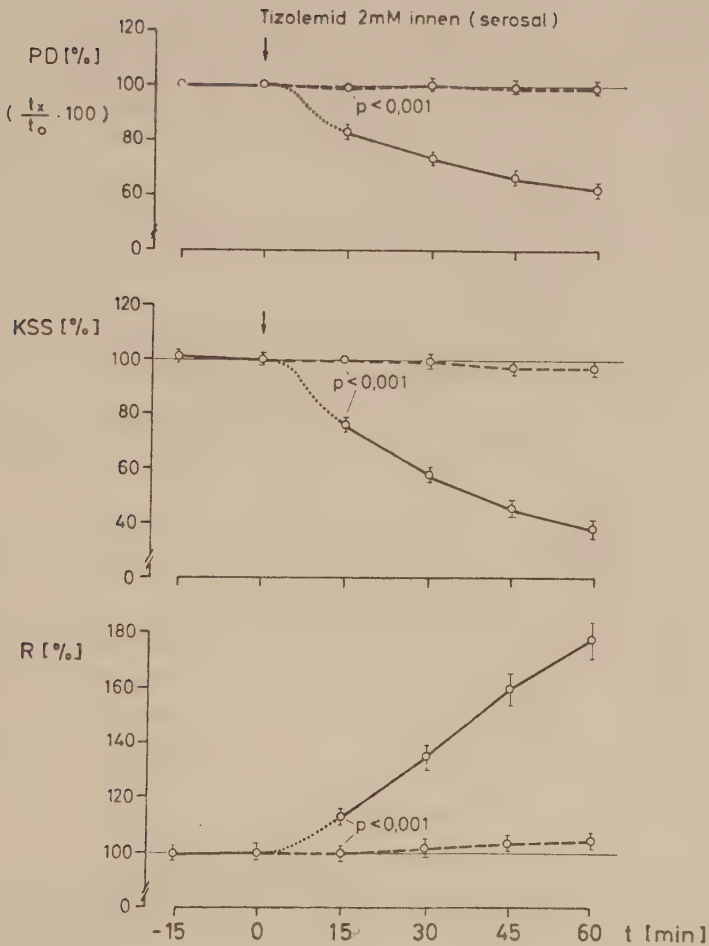
Um einen möglicherweise vorhandenen initialen Anstieg oder einen frühen Abfall von PD und/ oder KSS vor der ersten registrierten Messung 15 Minuten nach Substanzzugabe nicht zu übersehen, wurde in mehreren Versuchen und bei Zugabe verschiedener Konzentrationen das anfängliche Verhalten in Abständen von jeweils einer Minute beobachtet. In jedem Fall konnte bereits nach ca. 2 Min. ein Abfall von PD und KSS festgestellt werden, der zunehmend schneller stattfand und 45 bis 60 Minuten nach Substanzzugabe sein Maximum erreichte.

Die in den hier mitgeteilten Versuchen verwendeten Dosierungen hatten sich in Vorversuchen als noch mit Sicherheit wirksame Mengen erwiesen. Dabei war eine dosisabhängige Wirkung von Tizolemid festzustellen; eine genaue Dosiswirkungsanalyse wurde jedoch nicht durchgeführt. Nach 60minütiger serosaler Inkubation der Membranen mit verschiedenen Konzentrationen war ein Abfall des KSS auf folgende Werte festzustellen: 1 mM $\rightarrow$ 54 %, 2 mM $\rightarrow$ 34,7 %, 5 mM $\rightarrow$ 17 %, 10 mM $\rightarrow$ 12 % (vom Nullwert). Erst- und letztgenannte Daten sind Mittelwerte aus jeweils nur zwei Versuchen. Die unterschiedliche Wirkungsstärke des Diuretikums in 2 bzw. 5 millimolarer Konzentration ist in Abb. 8 dargestellt. Bereits nach 15minütiger Inkubation der Membranen waren PD und KSS signifikant unterschiedlich vermindert (PD: $p < 0,05$, KSS: $p < 0,001$).

Abb. 7 (S. 47)

Einfluß von Tizolemid (HOE 740 B, $2 \cdot 10^{-3} M$ in der serosalen Badlösung) auf Potentialdifferenz (PD), Kurzschlußstrom (KSS) und elektrischen Widerstand (R) der isolierten Bauchhaut von *Rana temporaria* (○—○ bzw. ○-----○), verglichen mit dem Verhalten der entsprechenden Kontrollversuche (○---○) im Verlauf von 60 Minuten Tizolemid-Exposition.

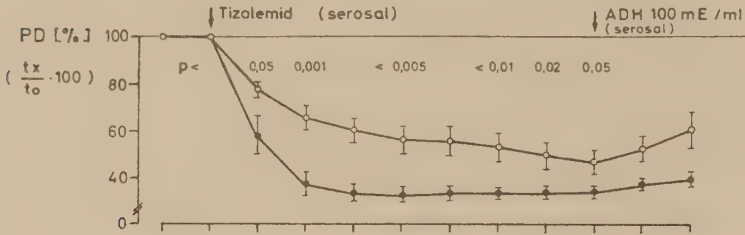
Im Zeitintervall 0 bis 15, d.h. von der Messung unmittelbar vor bis 15 Minuten nach Substanzzugabe, war kein annähernd lineares Verhalten der elektrischen Parameter festzustellen (s.Text). Der gepunktete Kurvenabschnitt deutet hier an, daß Messungen in einminütigem Abstand nur bei einem Teil der Versuche vorgenommen wurden. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte ($\bar{x} \pm SEM$) von 62 Experimenten und 39 Kontrollen mit paarigen und nichtpaarigen Membranen, dargestellt als prozentuale Änderungen der Ausgangswerte zum Zeitpunkt Null.



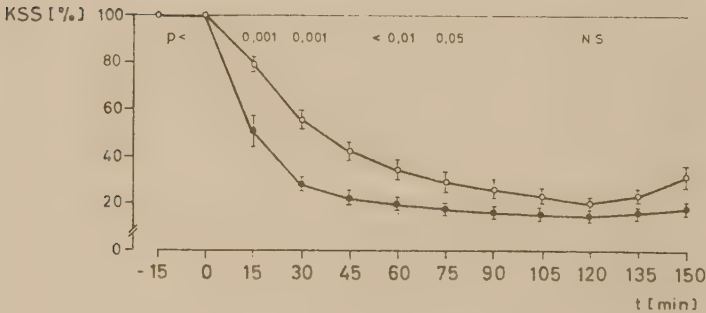
	Experiment	Kontrolle	
	○—○ ○—○	○—○	
mittlere PD (mV), ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) :	45,3 $\pm$ 2,9	57,4 $\pm$ 3,7	] zum Zeit- punkt Null
mittlerer KSS ($\mu\text{A} \cdot 3,14 \text{ cm}^{-2}$):	118,6 $\pm$ 3,9	98,5 $\pm$ 6,8	
Anzahl der Versuche :	62	39	

Abb. 8

Vergleich der Wirkungsstärke von Tizolemid 2 mM (○—○) und 5 mM (●—●). Beeinflussung von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom an der isolierten Bauchhaut von *Rana temporaria* bei serosaler Zugabe des Diuretikums. Die Kurven repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM von jeweils 11 Versuchen (prozentuale Änderungen vom Zeitpunkt Null).



	mittlere PD [mV]	mittl. KSS [$\mu A \cdot 3,14 cm^{-2}$]	N
Tizolemid 2 mM ○—○	$37,9 \pm 4,4$	$115,8 \pm 9,7$	11
Tizolemid 5 mM ●—●	$44,3 \pm 3,6$	$134,7 \pm 16,9$	11
zum Zeitpunkt Null			



Während PD und KSS beträchtlich, aber in unterschiedlichem Maße abfielen, stieg der aus den jeweiligen Einzeldaten berechnete ohmsche Membranwiderstand (R) nach Tizolemid an (Abb. 7). R nahm in den meisten Experimenten sofort nach Substanzzugabe zu, sank in einigen Versuchen aber erst ab (bis zu 80 %) um dann wieder auf Werte über dem Ausgangswert (Zeitpunkt Null) anzusteigen. In jedem der Experimente erhöhte sich der elektrische Widerstand im Verlauf von 60 Minuten Tizolemid-Einwirkung, so daß nach dieser Zeit ein durchschnittlicher Anstieg von R auf 177,9 % des Nullwertes zu beobachten war (Kontrollen: 104,8 %). Der Mittelwert von R in 62 Experimenten unterschied sich bereits 15 Min. nach Zugabe von Tizolemid statistisch signifikant vom Mittelwert der entsprechenden Kontrollversuche zum gleichen Zeitpunkt ($p < 0,001$).

Der Wirkung von Tizolemid liegt offenbar keine spezies-spezifische Empfindlichkeit von *Rana temporaria* zugrunde. Versuche mit den Spezies *Rana esculenta*, *Bufo bufo* und *Bufo marinus* (jeweils Bauchhäute) ergaben lediglich geringe quantitative Unterschiede in der Inhibition des KSS. Qualitativ konnte an allen vier Spezies von Amphibien die gleiche Wirkung von Tizolemid (2 mM, serosal) beobachtet werden.

Tab. 5 (S. 50)

Einfluß von Tizolemid (2 bzw. 5 mM, serosal) auf PD, KSS und ohmschen Membranwiderstand im Verlauf von 60 Minuten und geringer Effekt einer darauffolgenden 30minütigen Auswaschperiode. Die Daten der 5 Versuchsserien dieser Tabelle wurden aus Experimenten mit Fröschen der Spezies *Rana temporaria* (Jahreszeiten Sommer und Herbst/Winter) gewonnen. Das Verhalten der elektrischen Parameter nach Zugabe des Diuretikums sowie nach dreimaligem Badwechsel ist als prozentuale Änderung der Ausgangswerte (Absolutwerte zum Zeitpunkt Null) dargestellt.

	N	Absolutwerte z. Zeitpunkt	Zugabe von Tizolemide serosal				Badwechsel		
			Null	15'	30'	45'	60'	75'	90'
Kontrolle	5	PD	32 ± 4	99 ± 2	100 ± 3	101 ± 5	106 ± 5	107 ± 8	99 ± 9
		KSS	125 ± 7	100 ± 1	103 ± 2	104 ± 4	107 ± 5	120 ± 11	108 ± 13
		R	256 ± 13	98 ± 1	97 ± 2	98 ± 2	99 ± 1	90 ± 2	93 ± 3
Tizolemide 5 mM	6	PD	33 ± 4	54 ± 5	38 ± 5	37 ± 5	39 ± 6	37 ± 7	44 ± 8
		KSS	181 ± 18	58 ± 7	28 ± 4	20 ± 3	17 ± 3	17 ± 6	20 ± 3
		R	186 ± 17	98 ± 11	136 ± 13	190 ± 19	231 ± 20	228 ± 26	222 ± 21
Tizolemide 2 mM	10	PD	30 ± 9	81 ± 2	64 ± 6	58 ± 3	50 ± 3	48 ± 3	51 ± 3
		KSS	117 ± 5	76 ± 3	55 ± 4	43 ± 4	35 ± 3	31 ± 3	35 ± 4
		R	259 ± 27	108 ± 3	128 ± 5	140 ± 8	153 ± 11	164 ± 14	157 ± 14
Tizolemide 2 mM	10	PD	29 ± 3	81 ± 2	75 ± 3	68 ± 3	63 ± 3	64 ± 3	66 ± 4
		KSS	128 ± 6	75 ± 3	60 ± 3	49 ± 3	40 ± 4	38 ± 4	39 ± 4
		R	232 ± 21	109 ± 2	126 ± 7	142 ± 8	166 ± 12	182 ± 15	179 ± 17
Tizolemide 2 mM	7	PD	42 ± 5	84 ± 2	71 ± 2	65 ± 2	58 ± 4	62 ± 6	71 ± 6
		KSS	129 ± 13	83 ± 2	63 ± 2	53 ± 3	42 ± 3	43 ± 4	53 ± 5
		R	352 ± 68	101 ± 3	113 ± 4	125 ± 5	140 ± 8	145 ± 13	136 ± 10

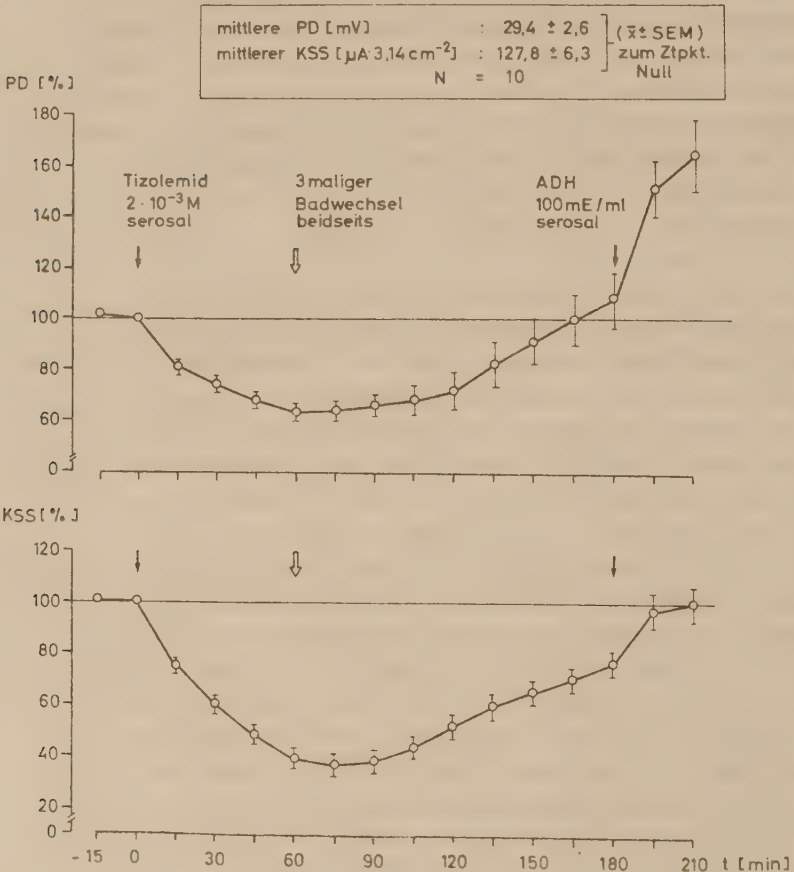
1.2 Auswascheffekt

Nachdem in orientierenden Versuchen festgestellt worden war, daß Tizolemid nach etwa einer Stunde Einwirkdauer (bei der Konzentration von 2 mM in der inneren Badlösung) sein Wirkungsmaximum nahezu vollständig erreicht hatte, wurde in allen weiteren Experimenten mit Tizolemid die Membran über diesen Zeitraum inkubiert. So wurde auch die Frage nach der Reversibilität der Tizolemid-Wirkung unter diesen Bedingungen untersucht: Nach 60 Minuten Inkubation wurden innere und äußere Badlösung gleichzeitig dreimal innerhalb von ca. 6 Minuten gewechselt (Austausch gegen frische Frosch-Ringerlösung), um eine vollständige Entfernung des Diuretikums zu erreichen. Die danach auftretenden Änderungen der elektrischen Parameter werden hier als *Auswascheffekt* bezeichnet.

Bei verschiedenen Versuchsserien (Tab. 5) wurde eine Auswaschperiode von 30 Minuten willkürlich festgelegt. Dabei zeigte sich übereinstimmend ein weiterer Abfall des KSS bis 15 Min. nach dem Badwechsel, und erst 30 Minuten später war gerade ein Wiederanstieg des KSS auf den entsprechenden Wert unmittelbar vor dem Badwechsel festzustellen. Ähnlich verhielten sich PD und - in umgekehrter Richtung - R. Die offenbar sehr feste und deshalb schwer reversible Bindung von Tizolemid an die serosale Membran der Froschhaut war gleichermaßen bei Sommer- (häufig ADH-refraktär) und Winter-Fröschen zu beobachten: So zeigten die Versuchsserie "Tizolemid 5 mM" (Tab. 5) vom Juli und die "Serie C" vom Dezember keine Unterschiede weder was ihre Beeinflussbarkeit durch das Diuretikum, noch was ihre zögernde Erholung nach dreimaligem beidseitigen Badwechsel betrifft.

Abb. 9

Effekt von beidseitigem dreimaligen Badwechsel auf Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom der isolierten Bauchhaut von *Rana temporaria*. Zugabe von Tizolemid 2 mM in die innere Badlösung, nach einer Stunde Ersatz beider Badlösungen durch frische Frosch-Ringerlösung, welche die Membran zwei Stunden lang beidseitig umspülte. Anschließend Zugabe von ADH (100 mE/ml) serosal. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der prozentualen Änderungen von den Ausgangswerten (=100%).



In einer weiteren Versuchsserie wurde die Erholungsphase nach ebenfalls dreimaligem Badwechsel auf zwei Stunden ausgedehnt (Abb. 9). 30 Minuten nach Ersatz der Badlösungen stiegen PD und KSS langsam und stetig an, so daß sich die PD 90 Min. nach dem Badwechsel nicht mehr signifikant vom Nullwert unterschied, wogegen KSS und R auch nach der zweistündigen Auswaschperiode noch signifikant verändert blieben ($p < 0,005$, t-Test für verbundene Stichproben). PD und KSS restituierten sich bis $107,9 \pm 10,3$ bzw. $76,7 \pm 4,5$ %. Dagegen nahm der Membranwiderstand zwischen 75 und 120 Minuten nach Zugabe von Tizolemid rasch ab (Kulminationspunkt: $182,0 \pm 15,1$ %, Mittelwert nach 60minütigem Badwechsel: 140 ± 12 %).

1.3 Einfluß von ADH

Wie bereits in Kap. II/3 beschrieben, induziert ADH eine Abfolge von Reaktionen, die schließlich eine Stimulation des transepithelialen Natriumtransportes und in dessen Gefolge die Erhöhung von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom zur Folge haben. Im Hinblick auf den Wirkungsmodus von Tizolemid, das den KSS in genau entgegengesetzter Richtung verändert, schien die Frage nach möglichen Interaktionen zwischen den von beiden Substanzen hervorgerufenen zellulären Reaktionen von Interesse.

Die ADH-Wirkung in vier verschiedenen Versuchsserien ist in Abb. 10 dargestellt (ADH in der supramaximalen Dosierung von 100 mE/ml). Dabei handelt es sich um Mittelwerte von Änderungen des KSS in absoluten Beträgen, weshalb die unterschiedlichen Ströme zum Zeitpunkt Null zu beachten sind. Die in den jeweils ersten beiden Säulen

dargestellten Daten entstammen Versuchen im August, die restlichen sind von Versuchen im November. In den Serien "... nach 90 Min. ADH" und "... nach 180 Min. ADH" überlagerten sich Änderungen des KSS infolge des Auswascheffektes und durch ADH bewirkte Stimulation. Abb. 10 gibt deshalb "bereinigte" Werte wieder, das sind Zunahmen der Kurzschlußströme nach 30 Min. ADH, abzüglich der in dieser Zeit zu erwartenden Auswascheffekte (aus Daten der Abb. 9).

Abb. 10 zeigt deutlich den in drei Serien weitgehend gleichen Abfall des KSS (absolute Beträge) bei vergleichbaren anfänglichen Kurzschlußströmen. Der durch ADH induzierte mittlere Anstieg des KSS war jedoch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tizolemid (2 mM) in der serosalen Badlösung wesentlich schwächer ausgeprägt. Während sich die ADH-Effekte von Kontrollen () sowie ADH 30 Minuten und 120 Minuten nach Badwechsel ( bzw. ) statistisch nicht signifikant unterschieden, der KSS also etwa auf gleiche Höhe stimulierbar war, ergab sich ein statistisch auffälliger bis signifikanter Unterschied zwischen den Versuchen mit ADH-Einwirkung bei gleichzeitiger weiterer Inkubation mit dem Diuretikum () und den drei vorgenannten Versuchsserien (Abb. 10).

ADH konnte in den vorliegenden Experimenten seine den Na-Transport (und damit den KSS) stimulierende Wirkung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tizolemid an der Innenseite der Amphibienhaut nur zu einem geringen Teil entfalten.

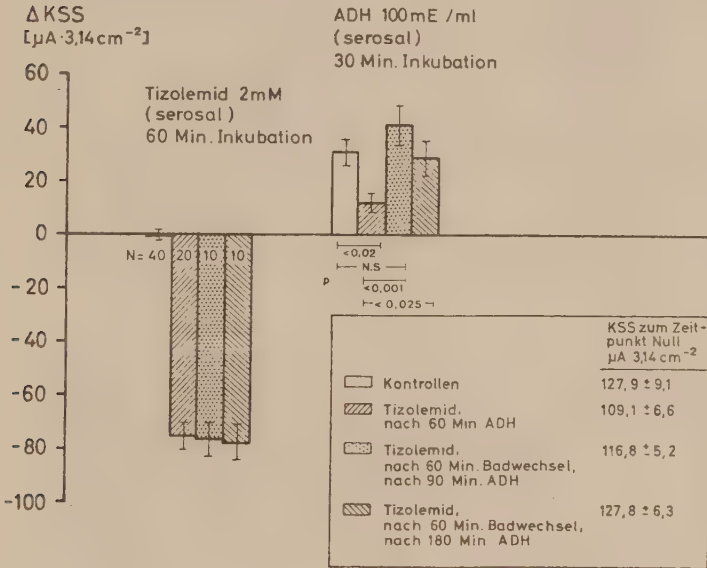
Abb. 10

Wirkung von ADH (100 mE/ml serosal) auf den Kurzschlußstrom der isolierten Bauchhaut von *Rana temporaria* unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

Linke Seite: Abnahme des KSS 60 Minuten nach Zugabe von Tizolemid 2 mM serosal, berechnet vom Zeitpunkt Null an (absolute Werte).

Rechte Seite: Anstieg des KSS 30 Minuten nach Zugabe von ADH, berechnet von dem Zeitpunkt unmittelbar vor der Vasopressinzugabe und unter Abzug des in der entsprechenden Zeit nach Badwechsel zu erwartenden Auswascheffekten (s.Text).

N.S. = nicht signifikant.



1.4 Wirkung von PGE_1

Prostaglandin E_1 stimuliert - ebenso wie ADH - den Na^+ -Nettotransport und damit den KSS über die Amphibienhaut bereits in einer Konzentration von 10^{-8}M (z.B. 50, 129). Für die vorliegenden Experimente wurde eine maximal wirksame Konzentration von 10^{-5}M gewählt. In 10 Kontrollversuchen mit einem mittleren anfänglichen KSS von $86,2 \mu\text{A}/3,14\text{cm}^2$ (zum Zeitpunkt Null) stieg dieser innerhalb von 30 Min. nach Zugabe von PGE_1 um etwa 50 % auf $128,0 \mu\text{A}/3,14\text{cm}^2$. Im Gegensatz zur ADH-Wirkung nahm jedoch der Widerstand im Mittel um 40,9 % (die PD lediglich um 2,2 %) ab, während es unter ADH zu einem leichten Anstieg des elektrischen Widerstandes kam.

Die durch PGE_1 hervorgerufene Zunahme des KSS war nach vorheriger 60minütiger Inkubation der inneren Membranseite mit Tizolemid (2 mM) deutlich vermindert (Abb. 12). Bei einem mittleren KSS von $95,8 \mu\text{A}/3,14\text{cm}^2$ zum Zeitpunkt Null und nach einem Abfall auf $43,7 \mu\text{A}/3,14\text{cm}^2$ betrug der PGE_1 -Effekt nur $7,5 \mu\text{A}/3,14\text{cm}^2$. In einer Versuchsserie mit 30minütiger Auswaschperiode nach ein-stündiger Einwirkung des Medikaments konnte dagegen wieder eine starke Erhöhung des KSS festgestellt werden. Während der 30minütigen PGE_1 -Einwirkung war Tizolemid nicht mehr in der Badlösung anwesend (vorangegangener Badwechsel!), weshalb in dieser Zeit neben dem durch PGE_1 bedingten KSS-Anstieg auch eine "Erholung" der Membran zu berücksichtigen war. Durch Abzug des zu erwartenden Auswascheffektes (aus Daten der Abb. 10) wurde der effektive PGE_1 -Effekt auf den KSS berechnet. Er unterschied sich von der PGE_1 -Wirkung an der mit Tizolemid inkubierten Haut statistisch signifikant mit $p < 0,005$, war jedoch nicht signifikant vom Anstieg des KSS der Kontrollen unterschieden.

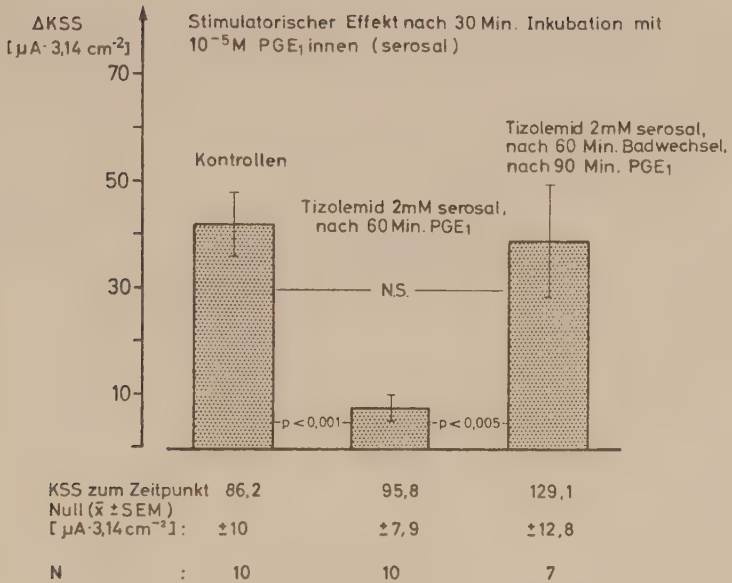


Abb. 11

Stimulatorischer Effekt von PGE₁ auf den Kurzschlußstrom der Froschhaut von *Rana temporaria* ohne (= Kontrollen) und mit vorheriger Inkubation der Membranen mit Tizolemid (= mittlere Säule) sowie bei Zugabe nach 30 Minuten Auswaschzeit (dreimaliger Badwechsel). In der rechten Säule sind korrigierte Werte aufgetragen (Abzug des Auswascheffektes, s. Text). Dargestellt sind aus absoluten KSS-Änderungen berechnete Mittelwerte $\pm$ SEM. N.S. = nicht signifikant.

1.5 Der Einfluß von Tizolemid bei Zugabe auf der Außenseite

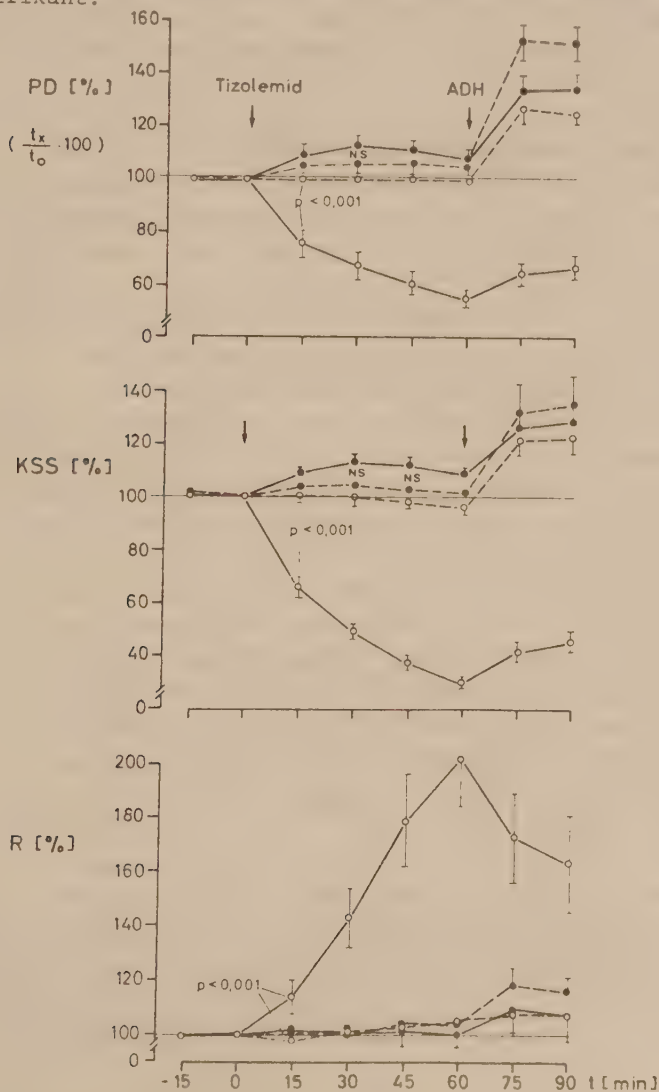
Schon orientierende Versuche zur Frage der Dosierung von Tizolemid an der Außenseite der Amphibienhaut zeigten kaum eine Wirkung des Diuretikums. Bei der hohen Konzentration von 5 mM in der mukosalen Badlösung war ein leichter Anstieg des KSS und parallel dazu eine gleich verlaufende Änderung der PD erkennbar (Abb. 13). Die größte Zunahme des KSS lag nach 30 Min. Inkubation bei $113,0 \pm 5,4 \%$ (maximaler Wert der PD: $112,5 \pm 3,4 \%$ vom Nullwert = 100 %). Im Verlauf der gesamten Einwirkzeit von einer Stunde veränderte sich der elektrische Membranwiderstand nicht wesentlich. Die Erhöhungen von PD und KSS waren bis einschließlich 60 Min. nach Substanzzugabe zu keinem Zeitpunkt signifikant oder auch nur statistisch auffällig gegenüber den entsprechenden Kontrollen verändert.

Diese Resultate stehen im Gegensatz zu der bereits bei viel geringerer Konzentration sehr ausgeprägten Wirkung an der serosalen Seite. Abb. 13 verdeutlicht die gegensätzlichen Befunde. Die folgende Aufstellung gibt die mittleren Absolutwerte von PD und KSS zum Zeitpunkt Null der in Abb. 13 dargestellten Versuchsserien wieder:

		mittlere PD (mV)	mittl. KSS ₂ (μ A/3,14cm ²)	Zahl der Versuche
Tizolemid	2 mM	$39,1 \pm 4,6$	$119,1 \pm 7,0$	14
serosal				
Kontrollen		$56,9 \pm 4,6$	$88,7 \pm 10,2$	20
Tizolemid	5 mM	$35,0 \pm 4,6$	$162,5 \pm 10,9$	15
mukosal				
Kontrollen		$37,1 \pm 7,0$	$166,3 \pm 13,2$	9

Abb. 12

Vergleichende Darstellung des Einflusses von Tizolemid 2 mM serosal (○—○) und Tizolemid 5 mM mukosal (●—●) auf PD, KSS und den daraus berechneten ohmschen Widerstand (R) der Froschhaut. Aufgetragen sind prozentuale Änderungen von den Ausgangswerten zum Zeitpunkt Null ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Zugabe von Tizolemid bzw. ADH (100 mE/ml serosal). NS = nicht signifikant.



2. Veränderung des osmotischen Wasserflusses unter der Einwirkung von Tizolemid

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Nettowasserfluß, d.i. der durch einen osmotischen Gradienten bewirkte und damit unidirektionale Wasserfluß über die Amphibienhaut (von außen nach innen), gemessen. Die Bauchhaut der Kröte schien für diese Experimente besonders geeignet (12).

Verschiedene Untersuchungen (4, 5, 22, 31, 74, 86, 104) geben Hinweise auf außerordentlich komplexe Vorgänge, welche dem durch die hier verwendete Methodik gemessenen transepithelialen Wasserfluß und seiner Stimulation durch ADH zugrunde liegen.

Der Einfluß von Tizolemid auf den hydroosmotisch induzierten transepithelialen Nettowasserfluß wurde in Analogie zu den bereits besprochenen Versuchen bei serosaler Zugabe in der Konzentration von 2 mM untersucht. Die in Abb. 13 dargestellten Befunde dieser Experimente an der isolierten Bauchhaut von Bufo-bufo-Kröten zeigten keine statistisch signifikante Beeinflussung des transepithelialen Wasserflusses während einstündiger serosaler Inkubation mit Tizolemid. Der basale Nettowasserfluß von $27,9 \pm 2,3 \mu\text{l} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot 30 \text{ min}^{-1}$ (Kontrollen: $27,4 \pm 6,9$) verringerte sich lediglich auf $20,8 \pm 3,2$ im Verlauf von 60 Minuten Einwirkdauer bei einer gleichzeitigen Abnahme des Wassertransports in den Kontrollversuchen auf $23,9 \pm 8,0 \mu\text{l} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot 30 \text{ min}^{-1}$ ($0,6 < p < 0,7$).

Dagegen war ein deutlicher Unterschied zwischen Experimenten und Kontrollen hinsichtlich des durch ADH (100 mE/ml) stimulierten Wasserflusses festzustellen (Abb. 13).

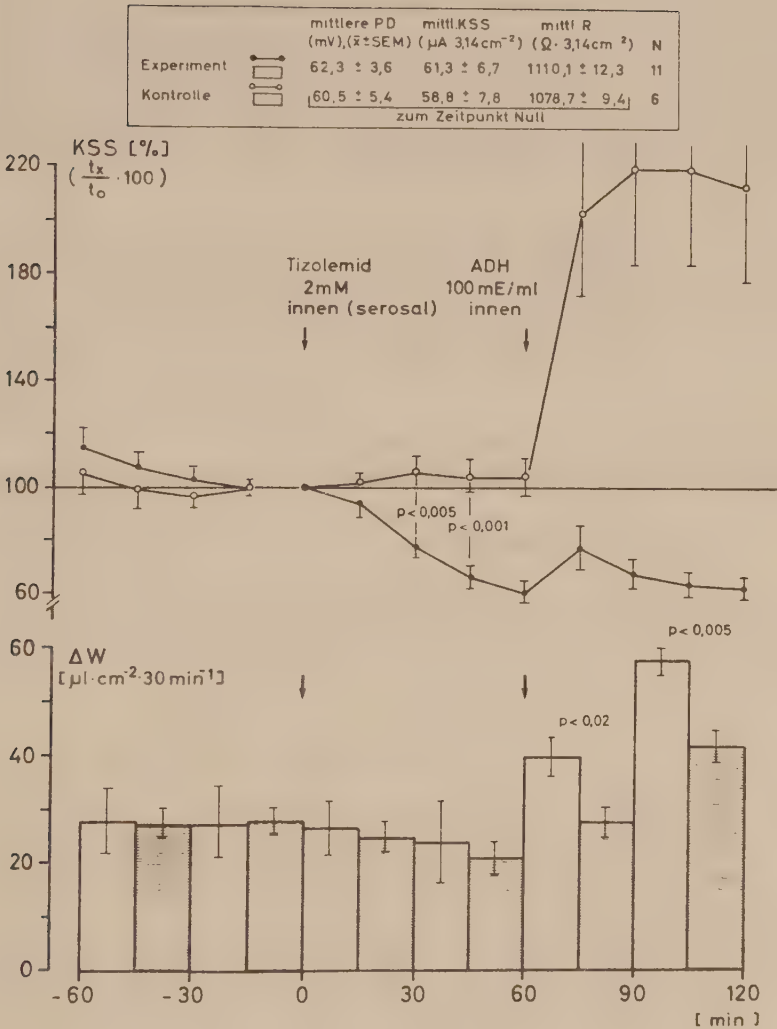


Abb. 13
 Einfluß von Tizolemid (2 mM, serosal) auf KSS und trans-epithelialen Nettowasserfluß (ΔW) an der isolierten Bauchhaut von *Bufo bufo*. Aufgetragen sind prozentuale Änderungen des KSS sowie absolute Beträge des hydroosmotischen Nettowasserflusses (jeweils $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tizolemid mit ADH an der Innenseite der Membran war dieser im Vergleich zu den Kontrollen in den ersten 30 Min. nach ADH-Zugabe mit $p < 0,02$, in der folgenden halben Stunde mit $p < 0,005$ verringert ($41,8 \pm 2,8$ in den Experimenten resp. $57,7 \pm 2,4 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot 30 \text{ min}^{-1}$ in den Kontrollen).

Auch der durch Tizolemid verringerte KSS konnte - in weit deutlicherem Ausmaß als dies bei Versuchen an Fröschen beobachtet worden war - durch ADH nicht den Kontrollen entsprechend erhöht werden.

3. Der Einfluß von Hydrochlorothiazid auf die elektrische Aktivität der Froschhaut

3.1 bei Zugabe auf der Innenseite

Zum besseren Vergleich mit Untersuchungen über die Wirkung von Tizolemid wurde auch Hydrochlorothiazid (HCT, vgl. S. 27 - 29) in der Dosierung von 2 mM verwendet. Die Anwesenheit der Substanz in der serosalen Badlösung führte an Fröschen der Species *Rana temporaria* zu einer Erhöhung des KSS (Na-Nettotransport). 15 und 30 Min. nach Zugabe des Diuretikums war dieser mit $p < 0,001$ signifikant angestiegen, nach 60 Min. war der Unterschied zum Mittelwert der Kontrollen nur noch statistisch auffällig mit $p < 0,05$. Der Verlauf des KSS-Anstiegs mit seinem höchsten Wert 30 Min. nach Zugabe von HCT ($128,9 \pm 5,6 \%$) und dem darauffolgenden Rückgang ist in Abb. 14 dargestellt.

Änderungen des KSS nach HCT (2 mM, serosal) waren von einem initialen Anstieg der PD ($p < 0,001$) begleitet, die jedoch im weiteren Verlauf wieder auf niedrigere Werte sank und sich nicht mehr stati-

stisch signifikant von der PD der Kontrollversuche unterschied (nach 15 Min.: $112,2 \pm 2,8 \%$). Der Widerstand der Membranen sank unter HCT (innen) ab, war aber erst 30 Min. nach dem Zeitpunkt Null statistisch auffällig von den Kontrollen unterschieden ($p < 0,05$).

ADH (100 mE/ml, serosal), zugegeben nach 60minütiger Inkubation der Membranen mit HCT und bei gleichzeitiger Anwesenheit des Diuretikums, bewirkte die für dieses Hormon charakteristische Erhöhung von KSS und PD. Eine Änderung des ADH-Effektes durch HCT wurde nicht beobachtet.

Die Wirkung von HCT an der Innenseite der Froschhaut war den Änderungen nach Tizolemid an der Außenseite qualitativ sehr ähnlich (Abb. 15). Während der KSS nach HCT (serosal) jedoch signifikant erhöht war, konnte dieser statistische Nachweis für den Einfluß von Tizolemid (mukosal) nicht erbracht werden.

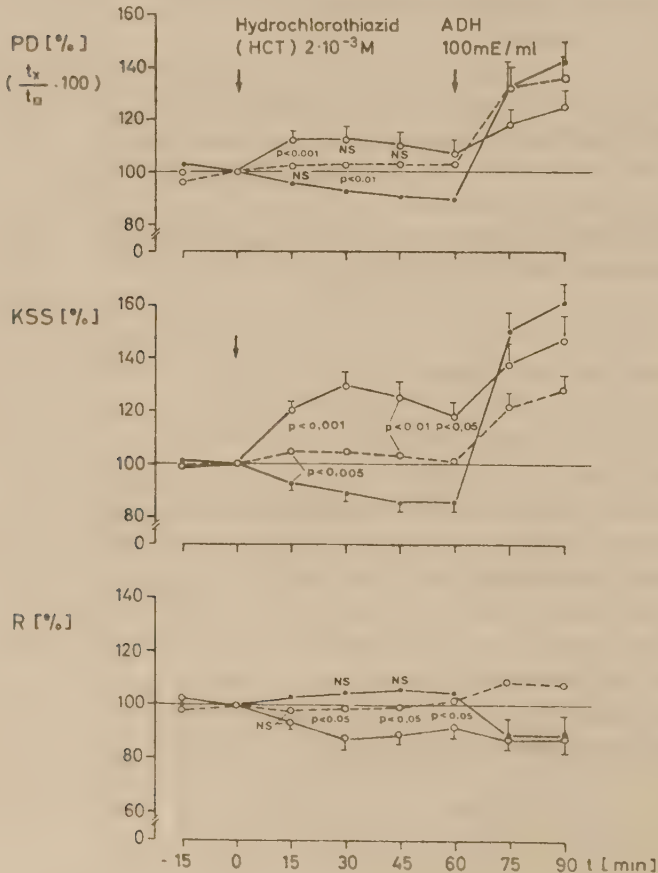
3.2 bei Zugabe auf der Außenseite

HCT (2 mM) in der äußeren Badlösung hatte - im Vergleich mit dem Effekt nach serosaler Zugabe des Medikaments - entgegengesetzte Veränderungen aller elektrischen Parameter zur Folge. Nach 15 Min. und bei den drei weiteren Messungen unter Einwirkung von HCT (mukosal) war der KSS signifikant verringert ($p < 0,005$, nach 60 Min. $86,0 \pm 3,5 \%$ vom Nullwert). Gleichzeitig nahm die Potentialdifferenz ab und unterschied sich nach 30 Min. mit $p < 0,01$ signifikant von den entsprechenden Kontrollwerten (niedrigster Wert: $89,5 \pm 2,5 \%$). Der leichte An-

Abb. 14

Das Verhalten von PD, KSS und errechnetem Widerstand an der isolierten Amphibienhaut (*Rana temporaria*) nach Zugabe von Hydrochlorothiazid (HCT) serosal (○—○) bzw. mukosal (●—●) in der jeweils gleichen Konzentration von 2 mM. Angegeben sind prozentuale Änderungen der Mittelwerte ($\pm$ SEM) nach Substanzzugabe (Zeitpunkt Null). Zugabe von 100 mE/ml ADH in die serosale Badlösung aller Versuche. NS = nicht signifikant.

	HCT außen	HCT innen	Kontrolle
mittlere PD LmV	$37,7 \pm 9,9$	$41,3 \pm 3,9$	$38,7 \pm 4,2$
mittl. KSS [μ A/3,14cm ²]	$93,5 \pm 3,4$	$165,0 \pm 10,7$	$167,3 \pm 12,1$
N	6	12	11



stieg des mittleren Membranwiderstandes war statistisch nicht auffällig (Abb. 14).

Auch nach Einwirkung von HCT auf der Außenseite des Froschhautepithels war ein deutlicher Anstieg von KSS und PD nach Zugabe von ADH (100 mE/ml, serosal) in allen Experimenten nachweisbar (KSS: $86,0 \pm 3,5 \%$ $\rightarrow$ $160,3 \pm 8,1 \%$, PD: $89,5 \pm 2,5 \%$ $\rightarrow$ $141,5 \pm 7,9 \%$, nach 30 Minuten ADH).

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die experimentellen Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Das Diuretikum Tizolemid (2 mM, an der Innenseite der Membran) verursachte - innerhalb von 60 Minuten - eine Abnahme des KSS auf etwa 40 % des Ausgangswertes (= 100%). Im gleichen zeitlichen Verlauf sank die PD auf ca. 60 %, während der aus PD und KSS berechnete ohmsche Widerstand auf etwa 180 % anstieg (Mittelwerte aus 62 Experimenten, S. 45 - 47).
2. An der mukosalen Seite der Froschhaut hatte das Diuretikum Tizolemid selbst in der hohen Konzentration von 5 mM keinen statistisch sicheren Einfluß auf die elektrischen Parameter (S. 58 - 59).
3. In Experimenten mit serosaler Tizolemid-Inkubation war innerhalb von 2 Minuten nach Substanzzugabe der Wirkungseintritt festzustellen. Die maximale Inhibition der elektrischen Aktivität war nach etwa 60 Minuten erreicht (S. 45 - 47).

4. Die serosale Wirkung von Tizolemid war nur schwer reversibel. In einer zweistündigen Erholungsphase nach 60minütiger serosaler Tizolemid-Einwirkung und darauffolgendem Auswaschen der Substanz erreichte der KSS das anfängliche Niveau nicht ganz (S. 51 - 53).
5. Diese starke blockierende Wirkung von Tizolemid auf den Natriumtransport (KSS) war dosisabhängig und konnte an vier verschiedenen Spezies von Amphibien beobachtet werden.
6. Der stimulatorische Effekt von ADH auf die elektrische Aktivität war bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tizolemid (serosal) vermindert. Bereits eine 30minütige Auswaschperiode vor Zugabe von ADH führte jedoch zur vollen Entfaltung der Hormonwirkung (bei nur geringfügiger Restitution der Membran, d.h. bei weiterhin niedrigem basalen KSS (S. 53 - 55).
7. Ebenso war der KSS-Anstieg nach PGE_1 in Gegenwart von Tizolemid signifikant verringert. Aber auch hier war - wie bei ADH - der PGE_1 -Effekt nach vorherigem Entfernen von Tizolemid wieder voll ausgeprägt (S. 56 - 57).
8. Eine Beeinflussung des basalen hydroosmotischen Nettowasserflusses durch Tizolemid (2 mM, einstündige serosale Inkubation, Bauchhaut der Kröte *Bufo bufo*) konnte nicht sicher nachgewiesen werden. Dagegen war auch hier eine Verminderung des durch ADH induzierten Wasserflusses bei Anwesenheit von Tizolemid festzustellen (S. 60 - 62).

9. Der Einfluß von Hydrochlorothiazid auf die elektrische Aktivität der Amphibienhaut war grundlegend verschieden von der Tizolemid-Wirkung und darüber hinaus weit schwächer ausgeprägt. Serosale Zugabe bewirkte einen Anstieg, mukosale einen Abfall des KSS (S. 62 - 65). Ein Vergleich beider Diuretika ist u.a. Gegenstand der Diskussion.

V. DISKUSSION

Von den im vorhergehenden Abschnitt ausführlich dargestellten Resultaten sind drei Aspekte von besonderer Bedeutung:

1. Hemmung des transepithelialen Natriumtransports durch serosale Zugabe des Diuretikums Tizolemid,
2. Interaktion der Tizolemid-Wirkung mit den stimulatorischen Effekten von ADH und PGE_1 ,
3. Abschwächung der ADH-Wirkung auf den hydroosmotischen Nettowasserfluß ohne gleichzeitigen Einfluß auf den basalen Wassertransport.

An dieser Stelle muß darauf verwiesen werden, daß es sich bei den vorliegenden Untersuchungen um die Analyse summativer transepithelialer Effekte handelt. Der Versuch der Einordnung dieser Befunde in das komplexe System der intra- und parazellulären Einzelschritte, aus denen sich transepitheliale Stoffbewegungen zusammensetzen (s. Kap. II/2), muß daher in Vielem spekulativen Charakter haben; weshalb auch Ergebnisse intrazellulärer Messungen anderer Autoren (122) in die Überlegungen mit einbezogen werden. Aus den diskutierten Möglichkeiten sollten sich jedoch Ansätze für eine weitere Analyse von Transportprozessen ergeben, in denen das Diuretikum dann unabhängig von seinem eigentlichen "pharmakologischen Zweck" auch als experimentelles Werkzeug dienen kann.

Vor dem Versuch, die experimentellen Befunde dieser Arbeit zu interpretieren, sind jedoch einige methodische Einwände kritisch zu erwägen.

1. Methodenkritik

Isolierte Amphibienmembranen zeigen physiologische Schwankungen ihrer spontanen elektrischen Aktivität, die u.a. vom Alter der Tiere, von Temperatur (81), Jahreszeit und hormonalen Einflüssen abhängig sind.

So kann beispielsweise durch Aldosteron ein Häutungszyklus induziert werden, der die elektrischen Eigenschaften wesentlich verändert: Ein ADH-refraktärer Abfall des KSS ist dabei von einem Wiederanstieg auf oft höhere Werte gefolgt (20, 39).

Der physiologische Vorgang eines "turn-over" von Epithelzellen - in vitro durch Aldosteron induzierbar (43) - ist besonders interessant bei der funktionellen Betrachtung des Epithels als Ganzes. Zellen des Stratum spinosum bilden am Ende des Häutungszyklus das Stratum granulosum und damit die äußere Barriere des Epithels. Offensichtlich entstehen neue tight junctions, serosale Membranen, die nach der Häutung die mukosale Zellmembran bilden, erhalten Na-Kanäle und ganz andere Permeabilitätseigenschaften (47).

Während der kalten Jahreszeit (Oktober bis April) induziert ADH eine deutlichere und anhaltende Zunahme des Kurzschlußstroms. In den Sommermonaten ist dagegen die ADH-Wirkung weit schwächer ausgeprägt oder manchmal auch gar nicht vorhanden. Die Steigerung des Natriumtransports durch PGE₁ unterliegt, analog zu dem saisonal unterschiedlichen Effekt von ADH, einer ähnlichen jahreszeitlichen Variation (60).

Auch Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration in mukosaler wie serosaler Badlösung modifizieren die elektrischen Parameter der Amphibienhaut. An der Krötenblase bewirkt die Senkung des pH in der serosalen Badlösung auf pH 6,8 nur eine geringe Abnahme des KSS, Erhöhung des pH auf 9,5 lediglich eine leichte initiale Zunahme gefolgt von einem Abfall (15). Nach Ansäuern der serosalen Badlösung auf pH 6,8 wurde jedoch eine signifikante Verminderung des ADH-induzierten Wasserflusses beschrieben (15). Dieser Sachverhalt wird in der Diskussion der eigenen Ergebnisse zu berücksichtigen sein (s.S. 79). Ansäuern der mukosalen Badlösung zeigte erst bei pH 6,1 eine signifikante Stimulation des KSS; im Bereich von pH 6,8 bis pH 9,5 konnte weder eine Veränderung des basalen KSS oder Wasserflusses noch eine Beeinflussung dieser Parameter nach ADH-Zugabe festgestellt werden (15). Ähnlich geringe Einflüsse des pH sind auch an der Froschhaut zu erwarten (134). Diese Daten zeigen, daß insbesondere Änderungen der elektrischen Parameter - wie sie in den hier durchgeführten Experimenten beobachtet wurden - nicht durch pH-Schwankungen in den Badlösungen erklärt werden können: Alle pH-Messungen lagen im Bereich von 7,2 bis 8,4 (S. 39).

Mit der bei den experimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Technik wurde die Amphibienhaut zwischen zwei flüssigkeitsgefüllte Kammern gespannt, um eine elektrische Isolation beider Badlösungen und das Abdichten der Kammern zu erreichen. Versuche von HELMAN und MILLER (67) zeigen indessen, daß der durch dieses Vorgehen erzeugte periphere Gewebeschaden ("edge damage") einen niederohmigen Shunt parallel zur intakten, zentral gelegenen Haut bildet. Dies führt zur Registrierung einer geringeren PD als tatsächlich von der Membran aufgebaut wird. Bei der quantitativen Bewertung von PD- und Widerstandsänderungen

ist dieser Sachverhalt daher zu berücksichtigen. Qualitative Änderungen können jedoch trotzdem mit ausreichender Genauigkeit festgestellt werden, zumal durch vorsichtiges und schonendes Einspannen der Membranen der edge-damage-Effekt gering gehalten werden kann (67).

Wie in Kap. II/1.3 (S. 9 - 10) begründet, ist nach USSING und ZERAHN der KSS ein direktes Maß für den aktiven transepithelialen Natriumnettotransport. Die Gültigkeit dieser These wurde bisher zwar in sehr vielen Experimenten und unter dem Einfluß verschiedenster Substanzen auf die Amphibienhaut bestätigt, doch kann sie in einer neuen experimentellen Situation keineswegs als gesichert gelten - z.B. im Falle einer möglichen selektiven Beeinflussung der Anionenpermeabilität - solange nicht simultane Messungen der Fluxraten (^{24}Na) und des KSS sie auch unter den gegebenen experimentellen Bedingungen verifizieren. Fluxanalysen während einstündiger serosaler Inkubation der Froschhaut von *Rana temporaria* mit Tizolemid (122) haben jedoch ergeben, daß auch unter dem Einfluß dieses Diuretikums die Äquivalenz von KSS und Rate des aktiven Na-Nettotransports über das Epithel besteht.

2. Wirkungscharakteristika von Tizolemid

Wie bereits eingangs erwähnt, war die hervorstechende Eigenschaft von Tizolemid sein starker und anhaltender Einfluß auf Kurzschlußstrom (KSS) und Potentialdifferenz (PD) bei serosaler Einwirkung. Die Abnahme des KSS, die als Inhibition des transepithelialen Natriumtransports gedeutet werden muß (s.o.), war begleitet von einem schwächeren, aber gleich verlaufenden Abfall der PD und damit einem deutlichen Anstieg des Membranwiderstandes. Dabei besteht eine Abhängigkeit zwischen der

transepithelial gemessenen PD und den Potentialen von mukosaler und serosaler Barriere. R ist der aus den Einzelwerten von PD und KSS berechnete ohmsche Widerstand der gesamten Haut, dessen Änderung als Hinweis auf eine veränderte Ionenpermeabilität gewertet wird.

Bei den vorliegenden Befunden handelt es sich um Ergebnisse globaler Messungen an der intakten Amphibienhaut ("black box"). Es kann deshalb nur auf indirektem Weg (z.B. Interaktion mit in ihrer Wirkung bereits bekannten Substanzen) auf den möglichen zellulären Wirkungsmechanismus geschlossen werden.

Zur Erklärung des Effektes von Tizolemid an der serosalen Seite der Amphibienhaut kommen hauptsächlich zwei Wirkungsmechanismen in Betracht:

1. Hemmung des aktiven Transportmechanismus für Na^+
2. Veränderung der Ionenpermeabilität der serosalen Barriere des Transportkompartiments.

Die Inhibition der "Na-Pumpe" in der serosalen Zellmembran könnte einem dem Ouabain analogen Wirkungsmechanismus entsprechen; wobei neben der direkten Hemmung der Na-K-ATPase auch an eine Störung energieliefernder Prozesse zu denken ist: Der so reduzierte serosale Ausstrom von Na^+ führt dabei zu einer erhöhten intrazellulären Na-Konzentration und gleichzeitig - aufgrund der inversen Relation zwischen zellulärem Na^+ - und K^+ -Gehalt (131) - zu einem Abfall der intrazellulären K-Konzentration. Daraus resultierte ein vermindertes Diffusionspotential für K^+ an der serosalen sowie für Na^+ an der mukosalen Barriere (vgl. Abb. 1, S. 13). Der in den vorliegenden Versuchen festgestellte Abfall der transepithelialen PD könnte Aus-

druck derartiger Veränderungen sein. Erhöhte intrazelluläre Na-Konzentration und vermindertes intrazelluläres Potential ergeben ihrerseits einen Anstieg des mukosalen Membranwiderstandes (R_o , der mukosale Na-Einstrom ist abhängig vom intrazellulären Potential (121) und von der intrazellulären Na-Konzentration (93)). Dabei wäre eine in der gleichen Größenordnung liegende Zunahme von R_o und R_i zu fordern, wie dies nach Blockade der Na-Pumpe mit Ouabain beobachtet wurde (118). Ergebnisse intrazellulärer Messungen unter serosaler Einwirkung von Tizolemid (122) widersprechen jedoch diesem Postulat; denn R_o steigt unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen nur geringfügig an. Noch wichtiger scheint ein Vergleich der Diffusionspotentiale an der serosalen Zellmembran unter dem Einfluß von Ouabain bzw. Tizolemid. Blockade der Na-Pumpe durch Ouabain führt zu einem deutlichen Abfall des Diffusionspotentials für K^+ (s.o.). Dagegen bleibt letzteres nach Tizolemid-Einwirkung weitgehend konstant bzw. fällt nur wenig im Vergleich zu der starken Abnahme des Na-Transports. Somit sind Veränderungen, wie sie nach Ouabain beschrieben wurden (verminderte Pumpaktivität $\longrightarrow$ intrazellulär erhöhte Na- und verminderte K-Konzentration $\longrightarrow$ Abnahme des serosalen Diffusionspotentials), als Erklärung für den Wirkungsmechanismus von Tizolemid eher unwahrscheinlich.

Auch für die Bewertung der zweiten Möglichkeit, einer Veränderung der Ionenpermeabilität der serosalen Barriere unter der Einwirkung von Tizolemid, sollen Ergebnisse intrazellulärer Potentialmessungen herangezogen werden, da transmembranäre Messungen alleine nur spekulative Aussagen über den Wirkungsmechanismus auf zellulärer Ebene zulassen würden.

Nur etwa 25 % des gesamten transzellulären Widerstandes sind der serosalen Zellmembran zuzuschreiben, der Rest entfällt auf die mukosale Barriere (68, 121). Eine mehrfache Zunahme von R_i wäre deshalb zur Erklärung des in den vorliegenden Untersuchungen beobachteten Anstiegs des transmembranären Widerstandes auf ca. 180 % (Abb. 7) erforderlich. Intrazelluläre Messungen unter Tizolemid-Einwirkung ergaben in der Tat einen Abfall der serosalen Zelleitfähigkeit um den Faktor 3-4 (bei nur geringer Änderung der Leitfähigkeit der mukosalen Zellmembran), entsprechend einem Anstieg des spezifischen Widerstandes der Innenmembran in der gleichen Größenordnung, wobei $R_i > R_o$ wurde (122). Umgerechnet entspricht dies einer Zunahme des transmembranären Widerstandes auf etwa 150 bis 175 %, was durchaus in Einklang mit den hier vorliegenden Ergebnissen von transmembranären Messungen steht. Da die passive Bewegung von K^+ den größten Teil des serosalen Diffusionspotentials der Froschhaut hervorruft, wäre die Zunahme von R_i deshalb primär auf Änderungen der K-Permeabilität an dieser Membran zurückzuführen. Der stark erhöhte serosale Membranwiderstand führt - bei vorhandenem Na-Transport - zu einem Spannungsabfall an dieser Membran mit intrazellulärer Depolarisation und vermindertem mukosalen Na-Einstrom.

In Übereinstimmung mit den Resultaten intrazellulärer Messungen erklärt das Postulat einer verminderten K-Permeabilität der serosalen Barriere unter Tizolemid-Einwirkung auch die vorliegenden Ergebnisse transepithelialer Untersuchungen. Die verminderte serosale Leitfähigkeit für K^+ verursacht eine Depolarisation, Abnahme des mukosalen Na-Einstroms und demzufolge eine geringere intrazelluläre Na-Konzentration mit der Folge einer erniedrigten Rate des aktiven Na-Transports über die serosale Zellmembran. Nach dieser Vorstellung zieht

allein die starke Verringerung der serosalen K-Permeabilität eine Reihe von Änderungen nach sich, aus denen transmembranär eine Abnahme von PD und KSS resultiert.

Die Tatsache, daß sich die elektrischen Parameter nach beidseitigem mehrmaligen Badwechsel nur sehr langsam restituierten (Abb. 9), deutet darauf hin, daß sich Tizolemid entweder extrazellulär an einen unbekannten Rezeptor an der serosalen Membranoberfläche, sei es ein Protein oder eine andere Verbindung, relativ fest anlagert oder seine Wirkung an der serosalen Membran von der zytoplasmatischen Seite aus hervorruft. Hierbei ist auch an eine Diffusionsverzögerung im bindegewebigen Corium zu denken, welche zumindest teilweise für die langsame Reversibilität der serosalen Wirkung verantwortlich gemacht werden könnte (78). Diese Zeitverzögerung ist beträchtlich länger als sie allein durch Diffusion der Substanz durch das serosale Bindegewebe erklärt werden kann. Die hier verfügbaren Daten reichen jedoch zur Klärung dieser Frage nicht aus. In den als Auswaschversuche bezeichneten Experimenten (S. 51 - 53) pendelte sich der transepitheliale Widerstand (R) nach 60 Minuten Badwechsel bei etwa 40 % über dem Ausgangswert ein. Dies deutet auf eine nach Tizolemid-Einwirkung veränderte Ionenpermeabilität, die auch in weiteren 60 Minuten nach dem Badwechsel unverändert blieb. Möglicherweise blieb ein gewisser Rest der Substanz über diesen langen Zeitraum an serosalen Membranstrukturen oder intrazellulär haften. Wäre dies nicht der Fall, so müßte mit irreversiblen Veränderungen an der Membran gerechnet werden, wofür jedoch kein Hinweis vorliegt.

Bei Annahme einer vorgegebenen Anzahl von Rezeptoren an der serosalen Membranoberfläche kann davon ausgegangen werden, daß - unter der Annahme einer nichtlinearen

Dosis-Wirkungs-Beziehung - höhere Dosen nicht in jedem Fall auch stärkere Wirkungen zeigen, so im Sättigungsbereich der Kurve. Die in Abb. 8 dargestellten Ergebnisse, wonach sich nach zweistündiger Inkubation die Effekte von Tizolemid 2 mM bzw. 5 mM serosal nicht mehr statistisch signifikant unterscheiden, können so gedeutet werden. Bei Verwendung niedrigerer Dosen wäre deshalb eine zunehmend lineare Dosis-Wirkungs-Relation denkbar. Der wesentlich raschere Wirkungseintritt nach 5 mM Tizolemid kann leicht dadurch erklärt werden, daß bei höherer Konzentration eine entsprechend schnellere Diffusion der Substanz durch das Bindegewebe des Coriums stattfindet, weshalb am Epithel eine wirksame Konzentration früher erreicht wird.

Wie bereits erwähnt, kann anhand der transepithelial meßbaren Änderungen nicht auf den molekularen Wirkungsmechanismus von Substanzen geschlossen werden. Dennoch sollen zwei Thesen über die Interaktion zwischen ADH-, PGE_1 - und Tizolemid-Wirkung kurz besprochen werden. Die einfachste Erklärung für den signifikant verminderten stimulatorischen Effekt von ADH und PGE_1 auf den Natriumtransport bei gleichzeitiger serosaler Einwirkung von Tizolemid (Abb. 10 und Abb. 11) besteht in der Annahme einer zweiten distinkten Wirkkomponente dieses Diuretikums auf das cAMP-System (S. 21). Hierbei könnte der fast volle stimulatorische Effekt von ADH und PGE_1 30 Minuten nach Badwechsel - d.h. zu einer Zeit, als die spontane Erholung des KSS noch gering war - damit erklärt werden, daß Tizolemid von einem intrazellulären Wirkort zur serosalen Seite hin nach außen diffundiert und damit die stimulatorische Komponente wieder voll auftritt, ungeachtet der weiterhin bestehenden, nur langsam reversiblen Membranwirkung. Fragwürdig bleibt jedoch, ob das polare Tizolemid-Molekül (Abb. 4) die serosale Zellmembran leicht zu passieren vermag. Zumin-

dest die mukosale Barriere scheint vollständig impermeabel für Tizolemid zu sein, was aus der grundverschiedenen Membranwirkung bei serosaler bzw. mukosaler Applikation geschlossen werden kann. Für das strukturell sehr ähnliche Diuretikum Furosemid ist am Blasenepithel von *Bufo marinus* ein hemmender Einfluß auf das cAMP-System nachgewiesen worden (53). Ob eine derartige Wirkung auch dem neuen Diuretikum Tizolemid zuzuschreiben ist, muß hier jedoch offen bleiben.

Grundsätzlich scheint die Forderung einer zusätzlichen Wirkkomponente von Tizolemid für die Erklärung der beobachteten Effekte nicht notwendig. Unter dem gleichzeitigen Einfluß von Tizolemid und ADH bzw. PGE_1 auf die Amphibienhaut könnte - unbeeinflusst von Tizolemid - die Na-Permeabilität der mukosalen Membran erhöht werden. Trotzdem bewirkte dies keinen über das registrierte Ausmaß hinausgehenden Anstieg des transepithelialen Na-Transports, da die durch Tizolemid veränderten intrazellulären Parameter (Potential, Na^+ - und K^+ -Konzentration) dem entgegen stehen (an der Froschhaut beträgt die Konzentration der Kationen Na^+ und K^+ im Transportkompartiment ca. 8 bzw. 120 mmol/kg Zellwasser, Lit. 131). Diesen Überlegungen scheinen die in den Abb. 10 und 11 dargestellten Resultate zu widersprechen, die eine volle Entfaltung der ADH- und PGE_1 -Wirkung nach Badwechsel nachweisen, obgleich in diesem Zeitraum nach mehrmaligem Badwechsel und ohne ADH bzw. PGE_1 eine fortbestehende Wirkung von Tizolemid zu verzeichnen war. Aus methodischen Gründen kann jedoch nicht experimentell untersucht werden, ob der sog. Auswascheffekt, d.i. das Verschwinden der basalen Wirkkomponente von Tizolemid, nicht unter ADH- oder PGE_1 -Einfluß wesentlich rascher verläuft. Es ist deshalb vorstellbar, daß ein anfangs nur gering erhöhter mukosaler Na-Einstrom nach ADH oder PGE_1 und in Abwesenheit von Tizole-

mid in der serosalen Badlösung zu einem zunehmenden K-Efflux und als Folge dessen zu einer beschleunigten Loslösung von Tizolemid von seinem Rezeptor führt. Letzteres bedeutete eine Zunahme der serosalen K-Leitfähigkeit, gefolgt von einem negativeren intrazellulären Potential und von einem reaktiv erhöhten Na-Influx. Die fast vollständige Entfaltung des stimulatorischen Effektes von ADH und PGE_1 nach Auswaschen von Tizolemid wäre so denkbar.

Ein experimentelles Ergebnis ist jedoch ohne das Postulat einer zweiten Wirkkomponente von Tizolemid kaum verständlich: der verminderte ADH-induzierte hydroosmotische Nettowasserfluß (Abb. 13). Nachdem ein Einfluß dieses Diuretikums auf die basale transepitheliale Wasserbewegung nicht nachgewiesen werden konnte, wäre die einfachste Erklärung für den verringerten ADH-Effekt auf den Nettowasserfluß in einer Furosemid-ähnlichen Wirkung auf das cAMP-System gegeben. Hierbei ist der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den ADH-induzierten Anstieg des Wasserflusses (s.S. 71, Lit. 15) zu erwähnen. Bei dem in den Wasserversuchen gemessenen pH von ca. 7,1 in der serosalen Badlösung wäre auch in den eigenen Experimenten ein geringer Einfluß denkbar. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, daß auch in den entsprechenden Kontrollversuchen das pH der serosalen Badlösung sich nicht wesentlich von dem in den Experimenten unterschied (ca. 7,6). Eine weitere Klärung dieses Sachverhaltes scheint im Hinblick auf die Frage nach dem molekularen Angriffspunkt von Tizolemid besonders interessant.

3. Vergleich zwischen Tizolemid und anderen Diuretika

Ein Vergleich der vier Diuretika Hydrochlorothiazid, Furosemid, Bumetanid und Tizolemid kann nur bezüglich ihrer basalen, den Na-Transport stimulierenden bzw. hemmenden Wirkungen durchgeführt werden, da weitergehende Erkenntnisse (z.B. die Frage nach der Interaktion mit PGE_1 oder der Beeinflussung des hydroosmotischen Nettowasserflusses) nicht für alle vier Substanzen vorliegen. Die aus der Literatur entnommenen Resultate von Untersuchungen mit den drei erstgenannten Medikamenten an isolierten Amphibienmembranen wurden bereits auf den Seiten 28 ff. dargestellt. Für Hydrochlorothiazid lagen keine ausreichend differenzierten Berichte vor, weshalb eigene Experimente durchgeführt wurden. In Abb. 15 sind die wesentlichen Effekte der vier Diuretika an der Amphibienhaut zusammengestellt.

Dabei werden Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede besonders deutlich erkennbar. Ein Abfall der PD nach serosaler Substanzzugabe von Tizolemid steht einem gegensinnigen Effekt der anderen Diuretika gegenüber. Jedoch ist auch über eine Abnahme der PD sowohl nach Bumetanid (89) als auch nach Furosemid (57) berichtet worden. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf die in den beschriebenen Versuchen verwendeten unterschiedlichen Spezies zurückzuführen (s.a. Tab. 2, S. 24 - 25). Wichtiger sind die übereinstimmenden Resultate der Wirkung auf den KSS nach serosaler Zugabe: Nur das Benzothiadiazin-diuretikum Hydrochlorothiazid bewirkt eine Stimulation des KSS, wogegen die drei anderen Substanzen eine qualitativ gleiche inhibitorische Wirkung entfalten. Die bei weitem stärkste Abnahme des KSS wird durch die neue Substanz Tizolemid herbeigeführt. Auch der aus PD und KSS berechnete ohmsche Membranwiderstand steigt nach

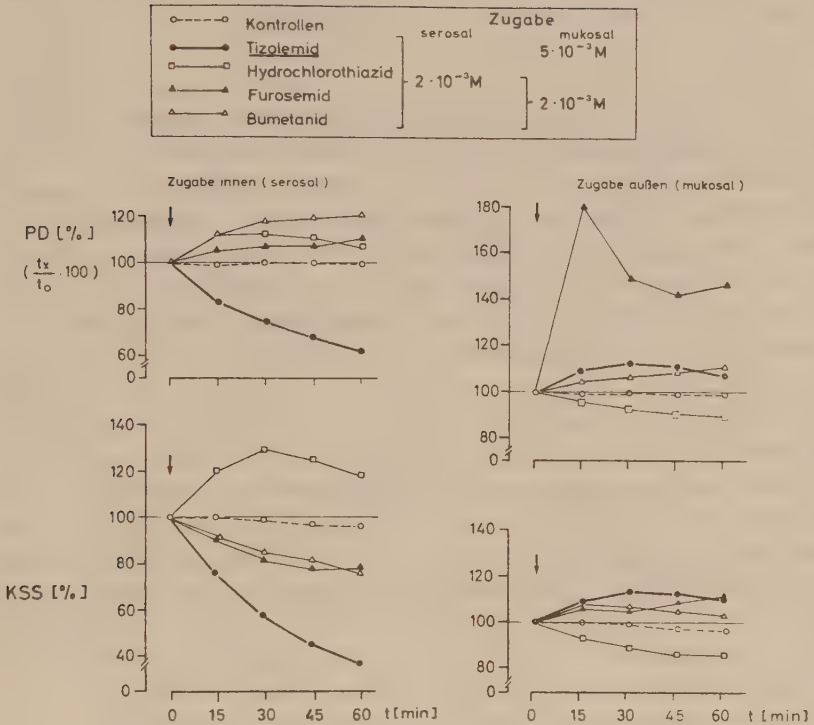


Abb. 15

Vergleichende Übersicht über den Einfluß von vier verschiedenen Diuretika auf Potentialdifferenz (PD) und Kurzschlußstrom (KSS) an der isolierten Bauchhaut von *Rana temporaria* im Verlauf von 60 Minuten. Auf der linken Seite ist der Effekt bei Diuretikumzugabe auf der Innenseite, rechts bei Zugabe auf der Außenseite der Membran dargestellt. Aufgetragen sind prozentuale Änderungen der Ausgangswerte zum Zeitpunkt Null (=100%). Die Kurven für Tizolemid und Hydrochlorothiazid ergaben sich aus Daten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen, bei den Kurven für Furosemid und Bumetanid handelt es sich um unveröffentlichte Befunde (44).

serosaler Zugabe von Furosemid, Bumetanid und Tizolemid an, nur unter Hydrochlorothiazid-Einwirkung wird ein leichter Abfall festgestellt.

Auch bei mukosaler Substanzeinwirkung induziert Hydrochlorothiazid im Gegensatz zu den anderen in Abb. 15 gegenübergestellten Diuretika einen Abfall von PD und KSS, während Tizolemid, Furosemid und Bumetanid einen jeweils geringen Anstieg des KSS bewirken. Auffallend ist ein beträchtlicher Anstieg der PD nach mukosaler Einwirkung von Furosemid, der auf eine Hemmung der Cl^- -Permeabilität der äußeren Barriere zurückgeführt wird (101, 108, 152).

Den gemeinsamen biologischen Wirkungen von Furosemid, Bumetanid und Tizolemid an der Amphibienmembran entsprechen sehr ähnliche chemische Strukturen (Abb. 4, S. 27), wobei jedoch betont werden muß, daß aufgrund der vorliegenden Befunde über einen Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und Wirkung nur spekuliert werden kann. Der Chlor-sulfamoyl-phenyl-Anteil scheint jedoch für die reversible Anlagerung an ein Protein oder Glykoproteid an biologische Membranen verantwortlich zu sein. Anstelle von Chlor hat Bumetanid einen 4-Phenoxy-Rest, was mit der nur bei Bumetanid beobachteten raschen Reversibilität seiner serosalen Membranwirkung in Zusammenhang gebracht werden könnte. Die spezifische Wirkung auf transzelluläre Transportvorgänge wäre dann dem anderen Molekülanteil zuzuschreiben. Hier bestehen weniger strukturelle Gemeinsamkeiten (Abb. 4); auch dies stünde in Einklang mit den in den Kapiteln II/4.1 und V/2 diskutierten Hypothesen zum molekularen Wirkungsmechanismus von Furosemid (Hemmung der Cl^- -Permeabilität der mukosalen Barriere, Interferenz mit

dem cAMP-System) und Tizolemid (Abnahme der K^+ -Permeabilität der serosalen Barriere).

Bei der Anwendung am Menschen zeigen Benzothiadiazin-diuretika (deren wichtigster Vertreter Hydrochlorothiazid in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde) eine langsam einsetzende und im Vergleich zu Furosemid und Bumetanid schwache diuretische Wirkung, was mit den in Kap. IV/3 dargestellten tierexperimentellen Versuchen in Einklang steht. Auch Tizolemid zeigt an der Säugertierniere ein den Benzothiadiazinen sehr ähnliches Wirkungsspektrum (*). Im Gegensatz zu diesen und auch im Gegensatz zu Furosemid und Bumetanid (die beide sowohl im experimentellen Modell als auch in der Säugetierniere eine starke Änderung des Elektrolyttransports hervorgerufen) zeigt Tizolemid bei serosaler Applikation nur an der Amphibienhaut eine auffallend starke Hemmung des KSS und damit des Natriumtransports. Ein völlig anderes, auf S. 75 diskutiertes Wirkprinzip könnte diesen Beobachtungen zugrunde liegen.

* Persönliche Mitteilung von Dr. Lahn, Fa. Hoechst, Frankfurt

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Frage nach dem Einfluß von Tizolemid auf den transepithelialen Elektrolyttransport über die isolierte Froschhaut schien wegen der möglichen klinischen Anwendung als Diuretikum und wegen seiner möglichen Bedeutung für die Erforschung transmembranaler Transportvorgänge interessant.

Folgende Befunde wurden mit Hilfe der von USSING und ZERAHN (142) angegebenen Kurzschlußstrom-Technik zur Messung der aktiven transepithelialen Natriumbewegung sowie der von LICHTENSTEIN et al. (94, 38) beschriebenen Methode zur Bestimmung des transepithelialen hydroosmotischen Nettowasserflusses erhoben:

1. In einer Konzentration von 2 mM auf der serosalen Seite der isolierten Bauchhaut von *Rana temporaria* verursachte Tizolemid innerhalb von 60 Minuten eine Abnahme des Kurzschlußstromes (entsprechend einer Abnahme des Na-Nettotransportes) auf etwa 40 % des Ausgangswertes. Im gleichen zeitlichen Verlauf sank die Potentialdifferenz auf ca. 60 %, während der aus beiden Parametern berechnete ohmsche Widerstand auf etwa 180 % anstieg (S. 45 - 47).
2. Diese starke inhibitorische Wirkung von Tizolemid auf den Natriumtransport war dosisabhängig (S. 46) und konnte in 4 verschiedenen Spezies von Amphibien beobachtet werden. Sie war nur sehr langsam - in einem Zeitraum von über 2 Stunden nach Auswaschen der Substanz - reversibel (S. 51 - 53).

3. An der mukosalen Seite der Froschhaut hatte das Diuretikum Tizolemid selbst in der vergleichsweise hohen Konzentration von 5 mM keinen statistisch sicheren Einfluß auf die elektrischen Parameter (S. 58 - 59).
4. Der stimulatorische Effekt von ADH auf die elektrische Aktivität war bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tizolemid (serosal) vermindert. Bereits eine 30minütige Auswaschperiode vor Zugabe von ADH führte jedoch zur vollen Entfaltung der Hormonwirkung (bei nur geringfügiger Restitution der Membran, d.h. bei weiterhin niedrigem basalen KSS (S. 53 - 55). In analoger Weise war der KSS-Anstieg nach PGE_1 - in Gegenwart von Tizolemid signifikant verringert - nach vorherigem Entfernen des Diuretikums wieder voll ausgeprägt (S. 56 - 57).
5. Eine Beeinflussung des basalen hydroosmotischen Nettowasserflusses durch Tizolemid (2 mM, einstündige serosale Inkubation, isolierte Bauchhaut der Kröte *Bufo bufo*) konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen war auch hier eine Verminderung des durch ADH induzierten Wasserflusses bei Anwesenheit von Tizolemid festzustellen (S. 60 - 62).

Die vorliegenden Ergebnisse werden im Hinblick auf den möglichen zellulären Angriffspunkt von Tizolemid sowie im Vergleich zur Wirkung anderer bekannter Diuretika diskutiert.

Im Vordergrund steht dabei die These, daß die durch Tizolemid induzierte Hemmung des transepithelialen Natriumtransportes Folge einer Reduktion der Leitfähigkeit der serosalen Barriere des Transportkompartimentes

ist. Eine Hemmung des aktiven Transportmechanismus für Natrium kommt insbesondere aufgrund des - im Gegensatz zur Wirkung von Ouabain - deutlich erhöhten trans-epithelialen Widerstandes als alleinige Erklärung für die beobachteten Veränderungen nach Tizolemid nicht in Betracht.

Die Beobachtungen hinsichtlich des stimulatorischen Effektes von ADH und PGE_1 unter dem Einfluß von Tizolemid geben Anlaß zu der Vorstellung von einer - direkten oder indirekten - Tizolemid-Einwirkung auf komplexe Mechanismen, die für die Steigerung des Natriumtransportes und für den Anstieg des Nettowasserflusses nach ADH verantwortlich sind.

Verglichen mit den Diuretika Furosemid, Bumetanid und Hydrochlorothiazid bewirkt Tizolemid in äquimolarer Konzentration bei serosaler Einwirkung auf die Amphibienmembran eine deutlich stärker ausgeprägte Abnahme des Kurzschlußstromes, verbunden mit einer ebenfalls beträchtlichen Abnahme der Potentialdifferenz (letzteres im Gegensatz zu den anderen Diuretika).

Zusätzlich unterscheidet sich Tizolemid wesentlich von den oben genannten Diuretika durch seinen Einfluß auf den stimulatorischen Effekt von ADH und PGE_1 . Tizolemid darf deshalb auch funktionell als Repräsentant einer neuen Klasse von diuretisch wirksamen Substanzen bezeichnet werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Aceves, J., Erlij, D. 1971.
Sodium transport across the isolated epithelium
of the frog skin.
J. Physiol. 212: 195
- 2) Aceves J. 1977.
Sodium pump stimulation by oxytocin and cyclic AMP
in the isolated epithelium of the frog skin.
Pflügers Arch. 371: 211
- 3) Aguilera, A.J., Kirk, K.L., DiBona, G.F. 1978.
Effect of magnesium on sodium transport in toad
urinary bladder.
Am. J. Physiol. 234: F 192
- 4) Andersen, B., Ussing, H.H. 1957.
Solvent drag on non-electrolytes during osmotic flow
through isolated toad skin and its response to anti-
diuretic hormone.
Acta Physiol. Scand. 39: 228
- 5) Andreoli, T.E., Schafer, J.A. 1976.
Mass transport across cell membranes: The effects of
antidiuretic hormone on water and solute flows in
epithelia.
Ann. Rev. Physiol. 38: 451
- 6) Asbury, M.J., Gatenby, P.B.B.B., O'Sullivan, S.,
Bourke, E. 1972.
Bumetanide: Potent new "loop" diuretic.
Brit. Med. J. 1: 211
- 7) Barry, E., Hall, W.J. 1969.
Stimulation of sodium movement across frog skin
by prostaglandin E_1 .
J. Physiol. 200: 83 P
- 8) Bentley, P.J. 1968. *JS*
Action of amphotericin B on the toad bladder:
Evidence for sodium transport along two pathways.
J. Physiol. 196: 703
- 9) Biber, T.U.L., Aceves, J., Mandel, L.J. 1972.
Potassium uptake across serosal surface of isolated
frog skin epithelium.
Am. J. Physiol. 222: 1366

- 10) Boyett, J.D., van Bruggen, J.T. 1976.
The effect of ethanol on ion transport in frog skin.
Biochim. Biophys. Acta 436: 686
- 11) Brunn, F. 1921.
Beitrag zur Kenntnis der Wirkung von Hypophysen-
extrakten auf den Wasserhaushalt des Frosches.
Z. ges. exp. Med. 25: 170
- 12) Buchborn, E. 1956.
Zur Kinetik des amphibischen Wasserhaushaltes bei
der Kröte.
Pflügers Arch. 262: 377
- 13) Buchborn, E., Anastasakis, S. 1964.
Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus von Furosemid
am distalen Nephron des Menschen.
Med. Wschr. 42: 1127
- 14) Burg, M., Stoner, L., Cardinal, J., Green, N. 1973.
Furosemide effect on isolated perfused tubules.
Am. J. Physiol. 225: 119
- 15) Carvounis, C.P., Levine, S.D., Hays, R.M. 1979.
pH-dependence of water and solute transport in
toad urinary bladder.
Kidney Int. 15: 513
- 16) Cereiijido, M., Rotunno, C.A. 1968.
Fluxes and distribution of sodium in frog skin:
A new model.
J. Gen. Physiol. 51: 280 s
- 17) Civan, M.M., DiBona, D.R. 1974.
Pathways for movement of ions and water across toad
urinary bladder. II. Site and mode of action of
vasopressin.
J. Membrane Biol. 19: 195
- 18) Claude, P. 1978.
Morphological factors influencing transepithelial
permeability: A model for the resistance of the
zonula occludens.
J. Membrane Biol. 39: 219
- 19) Crabbé, J. 1962.
The sodium-retaining action of aldosterone.
Arscia, Brüssel

- 20) Crabbé, J. 1977.
The mechanism of action of aldosterone.
In: Receptors and Mechanism of Action of Steroid Hormones. Ed. by J.R. Pasqualini (Vol. 8 of the Modern Pharmacology-toxicology Series).
Dekker, New York - Basel
- 21) Cuatrecasas, P. 1974.
Membrane receptors.
Ann. Rev. Biochem. 43: 169
- 22) Curran, P.F., McIntosh, J.R. 1962.
A model system for biological water transport.
Nature 193: 347
- 23) Curran, P.F., Herrera, F.C., Flanigan, W.J. 1963.
The effect of Ca and antidiuretic hormone on Na transport across frog skin. II. Sites and mechanisms of action.
J. Gen. Physiol. 46: 1011
- 24) Curran, P.F., Cereijido, M. 1965.
K fluxes in frog skin.
J. Gen. Physiol. 48: 1011
- 25) Cuthbert, A.W. 1972.
A double (series) pump model for transporting epithelia.
J. Theor. Biol. 36: 555
- 26) Cuthbert, A.W. 1973.
Evidence for multiple forms of receptors for amiloride in transporting epithelia.
Eur. J. Pharmacol. 23: 187
- 27) Cuthbert, A.W., Shum, W.K. 1974.
Amiloride and the sodium channel.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281: 261
- 28) Cuthbert, A.W., Shum, W.K. 1975.
Effects of vasopressin and aldosterone on amiloride binding in toad bladder epithelial cells.
Proc. R. Soc. London B 189: 543
- 29) Dainty, J., House, C.R. 1966:
"Unstirred layers" in frog skin.
J. Physiol. 182: 66

- 30) De Lorenzo, R.J., Walton, K.G., Curran, P.F., Greengard, P. 1973.
Regulation of phosphorylation of a specific protein in toad-bladder membrane by antidiuretic hormone and cyclic AMP, and its possible relationship to membrane permeability changes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 880
- 31) Diamond, J.M., Bossert, W.H. 1967.
Standing gradient osmotic flow: A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia.
J. Gen. Physiol. 50: 2061
- 32) Diamond, J.M. 1978.
Solute-linked water transport in epithelia.
In: Membrane Transport Processes, Vol. 1, ed. by J.F. Hoffman.
Raven Press, New York
- 33) Dicker, S.E. 1970.
The skin and bladder of amphibians as models for the mammalian nephron.
Hormones 1: 352
- 34) Dörge, A., Gehring, K., Nagel, W., Thureau, K. 1974.
Localization of sodium in frog skin by electron microprobe analysis.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281: 271
- 35) Dörge, A., Rick, R., Thureau, K. 1976.
Characterization of the transport pool for sodium in frog skin by X-ray microanalysis.
J. Physiol. 263: 202 P
- 36) Dörge, A., Rick, R., Kelson, S., Bauer, R., Thureau, K. 1976.
Evidence for a syncytial Na transport compartment in frog skin.
Pfügers Arch. 263: R 14
- 37) Du Bois Reymond, E. 1848.
Untersuchung über thierische Electricität.
Reimer, Berlin
- 38) Edelman, I.S., Petersen, M.J., Gulyassy, P.F. 1964.
Kinetic analysis of the antidiuretic action of vaso-pressin and adenosine-3', 5'-monophosphate.
J. Clin. Invest. 43: 2185

- 39) Edelman, I.S. 1978.
Candidate mediators in the action of aldosterone on Na⁺ transport.
In: Membrane Transport Processes, Vol. 1, ed. by J.F. Hofman.
Raven Press, New York
- 40) Eigler, J., Carl, H., Edel, H.H. 1966.
Zum Wirkungsmechanismus der Etacrynsäure. I. Mitteilung: Der Einfluß von Etacrynsäure und Furosemid auf Membranpotential und Kurzschlußstrom an der Krötenhaut.
Klin. Wschr. 44: 417
- 41) Eigler, J., Kelter, J., Renner, E. 1967.
Wirkungscharakteristika eines neuen Acylguanidins - Amiloride-HCl (MK 870) - an der isolierten Haut von Amphibien.
Klin. Wschr. 45: 737
- 42) Eigler, J., Crabbé, J. 1968.
Effects of diuretics on active sodium transport in amphibian membranes.
In: Renal Transport and Diuretics. Ed. by K. Thurau, H. Jahrmärker.
Springer, Berlin - Heidelberg - New York
- 43) Eigler, J. 1970.
Der Einfluß von Aldosteron auf Natriumtransport und transepithelialen Wasserfluß durch isolierte Bauchhaut von *Rana temporaria*.
Pflügers Arch. 317: 236
- 44) Eigler, J.
Persönliche Mitteilung (unveröffentlichte Befunde)
- 45) Erlij, D. 1976.
Basic electrical properties of tight epithelia determined with a simple method.
Pflügers Arch. 364: 91
- 46) Erlij, D., Martinez-Palomo, A. 1978.
Role of tight junctions in epithelial function.
In: Membrane Transport in Biology, Vol. 3, ed. by G. Giebisch, D.C. Tosteson, and H.H. Ussing.
Springer, Berlin - Heidelberg - New York

- 47) Erlj, D., Ussing, H.H. 1978.
Transport across amphibian skin.
In: Membrane Transport in Biology, Vol. 3, ed. by
G. Giebisch, D.C. Tosteson, and H.H. Ussing.
Springer, Berlin-Heidelberg - New York
- 48) Farquhar, M.G., Palade, G.E. 1965.
Cell junctions in amphibian skin.
J. Cell Biol. 26: 263
- 49) Farquhar, M.G., Palade, G.E. 1966.
Adenosine triphosphatase localization in amphibian
epidermis.
J. Cell Biol. 30: 359
- 50) Fassina, G., Carpenedo, F., Santi, R. 1969.
Effect of prostaglandin E₁ on isolated short-
circuited frog skin.
Life Sci. 8: 181
- 51) Ferguson, D.R. 1966.
Effects of frusemide on sodium and water trans-
port by the isolated toad bladder.
Br. J. Pharmac. Chemother. 27: 528
- 52) Ferguson, D.R., Twite, B.R. 1974.
Effects of vasopressin on toad bladder membrane
proteins.
J. Endocr. 61: 501
- 53) Ferguson, D.R., Twite, B.R. 1974.
Furosemide - pharmacology and cellular mode of
action.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281: 295
- 54) Francis, W.L. 1933.
Output of electrical energy by frog skin.
Nature 131: 805
- 55) Frömter, E., Diamond, J.M. 1972.
Route of passive ion permeation in epithelia.
Nature 235: 9
- 56) Fuhrman, F.A., Ussing, H.H. 1951.
A characteristic response of the isolated frog skin
potential to neurohypophyseal principles and its
relation to the transport of sodium and water.
J. Cell. Comp. Physiol. 38: 109

- 57) Fülgraff, G., Gulden, W.-D., Rudroff, W.-D. 1973.
Effect of furosemide on sodium transport in frog
skin - interaction with amiloride and ouabain.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 280: 23
- 58) Galeotti, G. 1904.
Concerning the EMF which is generated at the sur-
face of animal membranes on contact with different
electrolytes.
Z. Physik. Chem. 49: 542
- 59) Grinstein, S., Erlij, D. 1978.
Intracellular calcium and the regulation of sodium
transport in the frog skin.
Proc. R. Soc. London B 202: 353
- 60) Hall, W.J. 1973.
Seasonal changes in the sensitivity of frog skin to
prostaglandin and the effect of external sodium and
chloride on the response.
Ir. J. Med. Sci. 142: 230
- 61) Handler, J.S., Orloff, J. 1963.
Activation of phosphorylase in toad bladder and
mammalian kidney by antidiuretic hormone.
Am. J. Physiol. 205: 298
- 62) Handler, J.S., Orloff, J. 1971.
Factors involved in the action of cyclic AMP on the
permeability of mammalian kidney and toad urinary
bladder.
Ann. NY Acad. Sci. 185: 345
- 63) Handler, J.S., Orloff, J. 1973.
The mechanism of action of antidiuretic hormone.
In: Handbook of Physiology, Section 8: Renal
Physiology. Ed. by J. Orloff, S.R. Geiger.
American Physiological Society, Washington
- 64) Hansen, H.H., Zerahn, K. 1964.
Concentration of lithium, sodium, and potassium in
epithelial cells of the isolated frog skin during
active transport of lithium.
Acta Physiol. Scand. 60: 189
- 65) Hays, R.M., Leaf, A. 1962.
Studies on the movement of water through the iso-
lated toad bladder and its modification by vaso-
pressin.
J. Gen. Physiol. 45: 905

- 66) Hays, R.M. 1972.
Independent pathways for water and solute movement
across the cell membrane.
J. Membrane Biol. 10: 367
- 67) Helman, S.I., Miller, D.A. 1974.
Edge damage effect on measurements of urea and
sodium flux in frog skin.
Am. J. Physiol. 226: 1198
- 68) Helman, S.I., Fisher, R.S. 1977.
Microelectrode studies of the active Na transport
pathway of frog skin.
J. Gen. Physiol. 69: 571
- 69) Helman, S.I., Fisher, R.S. 1977.
Stratum corneum of frog skin: Inferences for studies
of Na entry and transport pool.
Am. J. Physiol. 232: C 37
- 70) Helman, S.I., Nagel, W. 1977.
Microelectrode studies of frog skin: Effect of
ouabain.
Fed. Proc. 36: 632
- 71) Helman, S.I., Els, W.J. 1978.
Mechanism of ADH and PGE_2 on Na transport in frog
skin: Studies with microelectrodes.
Physiologist 21: 52
- 72) Herms, W., Hofmann, K.E. 1965.
Untersuchungen an der Froschhaut zur Kenntnis des
Wirkungsmechanismus von Diuretica an transport-
aktiven Membranen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 251: 355
- 73) Herrera, F.C. 1966.
Action of ouabain on sodium transport in the toad
urinary bladder.
Am. J. Physiol. 210: 980
- 74) Hevesy, G.v., Hofer, E., Krogh, A. 1935.
The permeability of the skin of frogs to water as
determined by D_2O and H_2O .
Skand. Arch. Physiol. 72: 199

- 75) Higgins, J.T., Cesaro, L., Gebler, B., Frömter, E. 1975.
Electrical properties of amphibian urinary bladder epithelia. I. Inverse relationship between potential difference and resistance in tightly mounted preparations.
Pflügers Arch. 358: 41
- 76) Hirschmann, W., Nagel, W. 1978.
The outer membrane of frog skin: Impermeable to K^+ ?
Pflügers Arch. 373: R 48
- 77) Hong, S.K., Park, C.S., Park, Y.S., Kim, J.K. 1968.
Seasonal changes of antidiuretic hormone action on sodium transport across frog skin.
Am. J. Physiol. 215: 439
- 78) Hoshiko, T., Lindley, B.D., Edwards, C. 1964.
Diffusion delay in frog skin connective tissue: a source of error in tracer investigations.
Nature 201: 932
- 79) Huf, E.G. 1935:
Versuche über den Zusammenhang zwischen Stoffwechsel, Potentialbildung und Funktion der Froschhaut.
Pflügers Arch. 235: 655
- 80) Huf, E.G., Wills, J. 1951.
Influence of some inorganic cations on active salt and water uptake by isolated frog skin.
Am. J. Physiol. 167: 255
- 81) Huf, E.G., Doss, N.S. 1958.
Effect of temperature on electrolyte metabolism of isolated frog skin.
J. Gen. Physiol. 42: 525
- 82) Jard, S., Bourguet, J., Favard, P., Carasso, N. 1971.
The role of intercellular channels in the trans-epithelial transfer of water and sodium in the frog urinary bladder.
J. Membrane Biol. 4: 124
- 83) Karger, W. 1967.
Biophysical aspects of ionic transfer across membranes in relation to the mode of action of diuretics.
Protoplasma 63: 128

- 84) Katzin, L.J. 1940.
The use of radioactive tracers in the determination
of irreciprocal permeability of biological membranes.
Biol. Bull. 79: 342
- 85) Kidder, G.W., Cereijido, M., Curran, P.F. 1964.
Transient changes in electrical potentials across
frog skin.
Am. J. Physiol. 207: 935
- 86) Koefoed-Johnsen, V., Ussing, H.H. 1953.
The contributions of diffusion and flow to the
passage of D_2O through living membranes.
Acta Physiol. Scand. 28: 60
- 87) Koefoed-Johnsen, V., Ussing, H.H. 1957.
The effect of g-strophanthin (ouabain) on the active
transport of sodium through the isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 42: Suppl. 145, 87
- 88) Koefoed-Johnsen, V., Ussing, H.H. 1958.
The nature of frog skin potential.
Acta Physiol. Scand. 42: 298
- 89) Kramer, H.J. 1976.
Effects of bumetanide on sodium transport of the
isolated frog skin and on renal Na-K-ATPase.
Pharmacology 14: 481
- 90) Krogh, A. 1938.
The active absorption of ions in some freshwater
animals.
Z. vergl. Physiol. 25: 335
- 91) Leaf, A. 1967.
Membrane effects of antidiuretic hormone.
Am. J. Med. 42: 745
- 92) Leblanc, G. 1972.
The mechanism of lithium accumulation in the iso-
lated frog skin epithelium.
Pflügers Arch. 337: 1
- 93) Leblanc, G., Morel, F. 1975.
Na and K movements across the membranes of frog
skin epithelia associated with transient current
changes.
Pflügers Arch. 358: 159

- 94) Lichtenstein, N.S., Leaf, A. 1965.
Effect of amphotericin B on the permeability of the
toad bladder.
J. Clin. Invest. 44: 1328
- 95) Lindemann, B., van Dreissche, W. 1977.
Sodium-specific membrane channels of frog skin are
pores: Current fluctuations reveal high turnover.
Science 195: 292
- 96) Lindemann, B., van Dreissche, W. 1978.
The mechanism of Na uptake through Na-selective
channels in the epithelium of frog skin,
In: Membrane Transport Processes, Vol. 1, ed. by
J.F. Hoffman.
Raven Press, New York
- 97) Linderholm, H. 1959.
The frog skin as a model of kidney tubules for
studies of active transport of ions and the action
of diuretics.
In: Nierensymposium. Hrsg.: K. Kramer, K.J. Ullrich.
Thieme, Stuttgart 1960
- 98) Lipson, S., Hays, R.M. 1966.
The effect of ethacrynic acid and furosemide on
sodium transport and ionic permeability in the toad
bladder.
J. Clin. Invest. 45: 1042
- 99) Lipson, L.C., Sharp, G.W.G. 1971.
Effect of prostaglandin E₁ on sodium transport and
osmotic flow in the toad bladder.
Am. J. Physiol. 220: 1046
- 100) Lote, C.J., Rider, J.B., Thomas, S. 1974.
The effect of prostaglandin E₁ on the short-circuit
current and sodium, potassium, chloride, and calcium
movements across isolated frog (*Rana temporaria*)
skin.
Pflügers Arch. 352: 145
- 101) Lote, C.J. 1976.
Chloride transport in isolated frog (*Rana temporaria*)
skin - changes in short-circuit current, potential,
resistance, and chloride flux elicited by furosemide.
Pflügers Arch. 362: 181

- 102) Lyttkens, L. 1972.
Direct radioactive tracer analysis of membrane systems. The sodium transport pool in frog skin.
The Upsala J. Med. Sci.: Suppl. 11
- 103) Macknight, A.D.C., Leaf, A., Civan, M.M. 1971.
Effects of vasopressin on the water and ionic composition of toad bladder epithelial cells.
J. Membrane Biol. 6: 127
- 104) MacRobbie, E.A.C., Ussing, H.H. 1961.
Osmotic behaviour of epithelial cells of frog skin.
Acta Physiol. Scand. 53: 348
- 105) Martinez-Palomo, A., Erlij, D., Bracho, H. 1971.
Localization of permeability barriers in the frog skin epithelium.
J. Cell Biol. 50: 277
- 106) Mills, J.W., Ernst, S.A., DiBona, D.R. 1977.
Localization of Na⁺-pump sites in frog skin.
J. Cell Biol. 73: 88
- 107) Molina, G., Gonzales, J.O., Orozco, J.G. 1967.
Einfluß des antidiuretischen Hormons und des Furosemid auf den Natriumtransport.
Arzneimittel-Forsch. 17: 382
- 108) Montoreana, R., Rabito, C.A., Villamil, M.F. 1975.
Effect of furosemide on the permeability to Cl of the isolated skin of *Leptodactylus ocellatus*.
Experientia 31: 1306
- 109) Moore, P.F. 1968.
The effects of diazoxide and benzothiadiazine diuretics upon phosphodiesterase.
Ann. NY Acad. Sci. 150: 256
- 110) Morel, F., Leblanc, G. 1975.
Transient current changes and Na compartmentalization in frog skin epithelium.
Pflügers Arch. 358: 135
- 111) Morgan, T., Sakai, F., Berliner, R.W. 1968.
In vitro permeability of medullary collecting ducts to water and urea.
Am. J. Physiol. 214: 574

- 112) Mullen, T.L., Biber, T.U.L. 1978.
Sodium uptake across the outer surface of the frog skin.
In: Membrane Transport Processes, Vol. 1, ed. by J.F. Hoffman.
Raven Press, New York
- 113) Nagel, W., Karger, W. 1964.
Die Wirkung von 4-Chloro-N-(2-furylmethyl)-5-sulfamoyl-anthranilsäure (Lasix) auf ionenaktive Membranen.
Pflügers Arch. 281: 63
- 114) Nagel, W. 1976.
Intercellular junctions of frog skin epithelial cells.
Nature 264: 469
- 115) Nagel, W. 1976.
The intracellular electrical potential profile of the frog skin epithelium.
Pflügers Arch. 365: 135
- 116) Nagel, W. 1977.
Influence of lithium upon the intracellular potential of frog skin epithelium.
J. Membrane Biol. 37: 347
- 117) Nagel, W. 1977.
The dependence of the electrical potentials across the membranes of the frog skin upon the concentration of sodium in the mucosal solution.
J. Physiol. 269: 777
- 118) Nagel, W., Helman, S.I. 1977.
Evidence for electrogenic transport of Na in frog skin revealed in microelectrode studies.
Pflügers Arch. 368: R 22
- 119) Nagel, W. 1978.
Effects of antidiuretic hormone upon electrical potential and resistance of apical and basolateral membranes of frog skin.
J. Membrane Biol. 42: 99
- 120) Nagel, W., Moshagen, D. 1978.
Washout characteristics of tracer Na from the transport pool of frog skin.
Pflügers Arch. 374: 235

- 121) Nagel, W. 1979.
Inhibition of potassium conductance by barium in
frog skin epithelium.
Biochim. Biophys. Acta 552: 346
- 122) Nagel, W., Eigler, J., Früchtl, J. 1981.
Tizolemid-induced changes of passive transport
components across the basolateral membrane of
isolated frog skin.
Pflügers Arch. 391: 219
- 123) Orita, Y., Ando, A., Urakabe, S., Abe, H. 1976.
A metal complexing property of furosemide and
bumetanide.
Arzneimittel-Forsch. 26: 11
- 124) Orloff, J., Handler, J.S. 1962.
The similarity of effects of vasopressin, adenosine-
3',5'-phosphate (cyclic AMP), and theophylline on
the toad bladder.
J. Clin. Invest. 41: 702
- 125) Orloff, J., Handler, J.S. 1964.
The cellular mode of action of antidiuretic hormone.
Am. J. Med. 36: 686
- 126) Orloff, J., Handler, J.S., Bergström, S. 1965.
Effect of prostaglandin (PGE_1) on the permeability
response of toad bladder to vasopressin, theo-
phylline and adenosine 3',5'-monophosphate.
Nature 205: 397
- 127) Orloff, J., Handler, J.S. 1967.
The role of adenosine 3',5'-phosphate in the action
of antidiuretic hormone.
Am. J. Med. 42: 757
- 128) Petersen, M.J., Edelman, I.S. 1964.
Calcium inhibition of the action of vasopressin on
the urinary bladder of the toad.
J. Clin. Invest. 43: 583
- 129) Ramwell, P.W., Shaw, J.E. 1970.
Biological significance of the prostaglandins.
Recent Prog. Horm. Res. 26: 139
- 130) Rick, R., Dörge, A., Nagel, W. 1975.
Influx and efflux of sodium at the outer surface
of frog skin.
J. Membrane Biol. 22: 183

- 131) Rick, R., Dörge, A., Arnim, E.v., Thureau, K. 1978.
Electron microprobe analysis of frog skin epithelium: Evidence for a syncytial sodium transport compartment.
J. Membrane Biol. 39: 313
- 132) Rick, R., Dörge, A., Macknight, A.D.C., Leaf, A., Thureau, K. 1978.
Electron microprobe analysis of the different epithelial cells of toad urinary bladder - electrolyte concentrations at different functional states of transepithelial sodium transport.
J. Membrane Biol. 39: 257
- 133) Rosenthal, I. 1865.
Über das elektromotorische Verhalten der Froschhaut.
Arch. Anat. Physiol. 1865: 301
- 134) Schoffeniels, E. 1955.
Influence du pH sur le transport actif de sodium à travers la peau de grenouille.
Arch. Intern. Physiol. Biochim. 63: 513
- 135) Schultz, S.G. 1978.
Is a coupled Na-K exchange "pump" involved in active transepithelial Na transport? A status report.
In: Membrane Transport Processes, Vol. 1, ed. by J.F. Hoffman.
Raven Press, New York
- 136) Schwartz, I.L., Shlatz, L.J., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. 1974.
Target cell polarity and membrane phosphorylation in relation to the mechanism of action of anti-diuretic hormone.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 2595
- 137) Small, A., Cafruny, E.J. 1967.
Furosemide and hydrochlorothiazide do not have a common mode of action.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 176: 616
- 138) Sutherland, E.W., Rall, T.W. 1960.
Relation of adenosine-3',5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones.
Pharmacol. Rev. 12: 265

- 139) Tomlinson, R.W.S., Wood, A.W. 1976.
Catecholamine-induced changes in ion transport in short-circuited frog skin and the effect of β -blockade.
J. Physiol. 257: 515
- 140) Ussing, H.H. 1949.
The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.
Acta Physiol. Scand. 17: 1
- 141) Ussing, H.H. 1949.
The distinction by means of tracers between active transport and diffusion.
Acta Physiol. Scand. 19: 43
- 142) Ussing, H.H., Zerahn, K. 1951.
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 23: 110
- 143) Ussing, H.H. 1960.
Transport through epithelial membranes.
In: The Alkali Metal Ions in Biology, Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 13.
Springer, Berlin - Heidelberg - New York
- 144) Ussing, H.H., Windhager, E.E. 1964.
Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium.
Acta Physiol. Scand. 61: 484
- 145) Voûte, C.L., Ussing, H.H. 1968.
Some morphological aspects of active sodium transport. The epithelium of the frog skin.
J. Cell Biol. 36: 625
- 146) Voûte, C.L., Ussing, H.H. 1970.
The morphological aspects of shunt-path in the epithelium of the frog skin (*R. temporaria*).
Exptl. Cell Res. 61: 133
- 147) Voûte, C.L., Møllgård, K., Ussing, H.H. 1975.
Quantitative relationship between active sodium transport, expansion of the endoplasmic reticulum, and specialized vacuoles ("scalloped sacs") in the outermost living cell layer of the frog skin (*Rana temporaria*).
J. Membrane Biol. 21: 273

- 148) Watlington, C.O., Jessee jr., E.F. 1975.
Furosemide inhibition of Cl⁻ flux in isolated
frog skin.
Clin. Res. 23: 377 A
- 149) Weinryb, I., Chasin, M., Free, C.A., Harris, D.N.,
Goldenberg, H., Michel, I.M., Paik, V.S., Phillips,
M., Samaniego, S., Hess, S.M. 1972.
Effects of therapeutic agents on cyclic AMP metabo-
lism in vitro.
J. Pharm. Sci. 61: 1556
- 150) Wright, E.M., Smulders, A.P., Tormey, J.M. 1972.
The role of the lateral intercellular spaces and
solute polarization effects in the passiv flow of
water across the rabbit gallbladder.
J. Membrane Biol. 7: 198
- 151) Yonath, J., Civan, M.M. 1971.
Determination of the driving force of the Na⁺ pump
in toad bladder by means of vasopressin.
J. Membrane Biol. 5: 366
- 152) Yorio, T., Bentley, P.J. 1976.
Effect of furosemide on unidirectional fluxes of
sodium and chloride across the skin of the frog,
rana pipiens.
Biochim. Biophys. Acta 455: 831
- 153) Yorio, T., Bentley, P.J. 1976.
Effects of ethanol on the permeability of toad
urinary bladder epithelium.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 197: 188
- 154) Zerahn, K. 1955.
Studies on the active transport of lithium in the
isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 33: 347
- 155) Zerahn, K. 1969.
Nature and localization of the sodium pool during
active transport in the isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 77: 272
- 156) Ziegler, T.W. 1976.
A new model for regulation of sodium transport in
high resistance epithelia.
Med. Hypothesis 2: 85

LEBENS LAUF

- Personalien: Josef Konrad Früchtl,
geboren am 13.12.1951 in
Cham-Altenmarkt
- Schulbesuch: 1. Volksschule Cham von September
1958 bis Juli 1966; Volksschul-
abschluß
2. Berufsschule in Ludwigshafen/Rh.
von Oktober 1966 bis März 1970
3. Berufsaufbauschule Ludwigshafen
von September 1968 bis Juli
1971; Abschluß: Fachschulreife
4. Ketteler-Kolleg Mainz von Sep-
tember 1971 bis Januar 1974;
Abschluß: Hochschulreife
- Berufsausbildung: 3 1/2-jährige Ausbildung zum Stark-
stromelektriker bei der Badischen
Anilin- und Soda-Fabrik (BASF) in
Ludwigshafen von Oktober 1966 bis
März 1970; Abschluß: Facharbeiter
- Berufsl. Tätigkeit: Beschäftigung als Kontrolleur im
Prüffeld der Elektro-Hauptwerkstatt
der BASF von April 1970 bis August
1971
- Zivildienst: Ableistung des Zivildienstes von
Januar 1974 bis März 1975 in der
Orthopädischen Universitätsklinik
in Erlangen
- Studium: Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität in
München von April 1975 bis Oktober
1981; Staatsexamen und Approbation
als Arzt im November 1981.

